

Aus dem Institut für Anatomie
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
- Geschäftsführender Vorstand: Prof. Dr. Sievers -

UNTERSUCHUNGEN ZUM EINFLUSS VON VERLETZENDER KOMPRESSION, INTERLEUKIN-1 UND ANTIOXIDANTIEN AUF BOVINES MENISKUSGEWEBE

Inauguraldissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von MARTIN HUFELAND

aus Hildesheim

Kiel (2010)

Referent: Prof. Dr. Kurz

Korreferent: Prof. Dr. Hassenpflug

Tag der mündlichen Prüfung: 26.07.2010

Zum Druck genehmigt, Kiel, den 26.07.2010

gez. Prof. Dr. Dr. Cascorbi

(Vorsitzender des Ausschusses für Promotion)

Für meine Eltern

Inhaltsverzeichnis

	Seite
Abkürzungsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	III
Tabellenverzeichnis	V
 1. Einleitung	 1
1.1. Allgemeines	1
1.1.1. Anatomie und Funktion der Kniegelenksmenisken	1
1.1.2. Histologie des Meniskugewebes.....	2
1.2. Ursachen für Meniskusschäden	4
1.2.1. Einfluss von Interleukin-1 auf Meniskus und Gelenkknorpel	5
1.2.2. Auswirkung von oxidativem Stress auf Meniskus und Gelenkknorpel.....	6
1.2.3. Funktion und Induktion der Matrixmetalloproteinasen.....	7
1.2.4. Funktion und Induktion der Aggrekanasen	10
1.2.5. Einfluss von mechanischer Überlastung auf Meniskus und Gelenkknorpel	12
1.3. Zielsetzung der Arbeit	14
 2. Material und Methoden.....	 16
2.1. Materialien	16
2.1.1. Chemikalien und Reagenzien.....	16
2.1.2. Kulturbedingungen	17
2.1.3. Herstellung der bovinen Meniskusexplantate	18
2.1.4. Aufbau und Funktion der Druckmaschine.....	20
2.2. Methoden	21
2.2.1. Anwenden der verletzenden Kompression	21
2.2.2. Versuchsablauf	21
2.2.3. Messung der GAG-Konzentration in den Kulturüberständen	22

2.2.4.	Messung der NO-Konzentration in den Kulturüberständen.....	22
2.2.5.	Messung der LDH-Aktivität in den Kulturüberständen	23
2.2.6.	Durchführung der real time RT-PCR	23
2.2.6.1.	Isolierung der RNA aus dem Meniskusgewebe	23
2.2.6.2.	Bestimmung der RNA-Menge.....	24
2.2.6.3.	Reinigung der RNA	25
2.2.6.4.	Vervielfältigung der RNA.....	25
2.2.6.5.	Auswertung der real time RT-PCR Ergebnisse	27
2.2.7.	Fixieren der Gewebeproben für histologische Untersuchungen.....	28
2.2.7.1.	Färbung der histologischen Schnitte mit Toluidinblau.....	29
2.2.7.2.	Färbung der histologischen Schnitte nach der TUNEL-Methode	29
2.3.	Statistische Auswertung	30
3.	Ergebnisse	31
3.1.	Lichtmikroskopische Darstellung des Meniskusgewebes	31
3.2.	Untersuchungen zum Gegendruck des Meniskusgewebes unter Kompression.....	32
3.2.1.	Verlauf des Gegendrucks während der Kompression.....	32
3.2.2.	Gegendruck des Meniskusgewebes bei steigender Kompressionsstärke.....	33
3.3.	Untersuchungen zum GAG-Verlust	34
3.3.1.	Einfluss von ansteigender Kompressionsstärke auf den GAG-Verlust.....	34
3.3.2.	Einfluss von IL-1 und Kompression auf den GAG-Verlust	35
3.3.3.	Einfluss von Antioxidantien und Kompression auf den GAG-Verlust	36
3.4.	Untersuchungen zur NO-Freisetzung	37
3.4.1.	Einfluss ansteigender Kompressionsstärke auf die NO-Freisetzung.....	37
3.4.2.	Einfluss von IL-1 und Kompression auf die NO-Freisetzung.....	38
3.4.3.	Einfluss von Antioxidantien und Kompression auf die NO-Freisetzung.....	39
3.5.	Untersuchungen zur mRNA-Expression von matrixdegradierenden Enzymen	40
3.5.1.	Einfluss steigender Kompressionsstärken auf die mRNA-Expression	40
3.5.2.	Einfluss von IL-1 und Kompression auf die mRNA-Expression.....	42

3.5.3.	Einfluss von Antioxidantien und Kompression auf die mRNA-Expression.....	44
3.6.	Untersuchungen zur Zellvitalität	45
3.6.1.	Einfluss von Kompression und Antioxidantien auf die LDH-Aktivität	45
3.6.2.	Einfluss von Kompression und Antioxidantien auf den Zelltod	47
4.	Diskussion	49
4.1.	In Vitro Kompression von Gelenkknorpel und Meniskus	49
4.2.	GAG-Verlust aus dem Meniskusgewebe	50
4.3.	NO-Freisetzung aus dem Meniskusgewebe	52
4.4.	Expression matrixdegradierender Enzyme im Meniskusgewebe	55
4.5.	Abnahme der Zellvitalität im Meniskusgewebe durch verletzende Kompression	57
4.5.1.	Nachweis von Zelltod in der TUNEL-Färbung	57
4.5.2.	LDH-Aktivität im Kulturmedium.....	58
4.6.	Schlussfolgerung und Ausblick.....	59
5.	Zusammenfassung	61
6.	Literaturverzeichnis	63
	Danksagung	73
	Lebenslauf	74

Abkürzungsverzeichnis

ADAMTS	"a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin type I motif"
bp	Basenpaare
cDNA	komplementäre DNA
DMEM	Dulbecco´s Modified Eagle Medium
DMMB	Dimethylmethylenblau
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
EDTA	Ethyldiamintetraacetatessigsäure
ELISA	"enzyme-linked immuno sorbent assay"
EZM	Extrazellulärmatrix
FG	Feuchtgewicht
GAG	Glykosaminoglykane
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
h	Stunde(n)
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HBSS	Hanks´ Buffering Salt Solution
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl) Piperazin-1-Ethansulfonsäure
K	Kompression
IL-1	Interleukin-1
iNOS	induzierbare NO-Synthase
NAC	N-Acetyl-Cystein
MMP	Matrixmetalloproteinase
mRNA	Boten ("messenger")-RNA
MT-MMP	membrangebundene ("membrane-type") Matrixmetalloproteinase
NO	Stickoxid
OD	optische Dichte
PBS	"phosphate-buffered saline"
PCR	"polymerase chain reaction", Polymerase-Kettenreaktion
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
RT-PCR	Reverse-Transkription Polymerase-Kettenreaktion
SDS	Sodium (Natrium)-Dodecyl-Sulfat
s	Sekunde(n)

SOD	MnTMPyP=Manganese(III)tetrakis (1-methyl-4-pyridyl) Porphyrin Pentachlorid
TIMP	"tissue inhibitor of matrixmetalloproteinases"
T _m	optimale Schmelztemperatur
TNF- α	Tumor Necrose Faktor Alpha
UV	Ultraviolett
w/v	Gewicht/Volumen

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Schematische Darstellung zur Lage der Menisken im Kniegelenk (A) sowie des Tibiaplateaus mit den aufliegenden Menisken nach Entfernung des Femurs (B)	2
Abb. 2: Schematische Darstellung des Kollagenfasengerüsts im Meniskus.....	3
Abb. 3: Fotografische Abbildung der bovinen Menisken und schematische Darstellung der Explantatgewinnung	18
Abb. 4: Schematische Darstellung der verwendeten Druckapparatur, der Polysulfatkammer sowie grafische Darstellung des Kompressionsvorganges.....	20
Abb. 5: Lichtmikroskopische Darstellung des Meniskugewebes (Toluidinblau Färbung)	31
Abb. 6: Grafische Darstellung, des vom Meniskugewebe ausgeübten Gegendrucks für drei exemplarische Kompressionsvorgänge.....	32
Abb. 7: Grafische Darstellung des maximalen, durch das Meniskugewebe ausgeübten Gegendrucks bei verschiedenen Kompressionsstärken.....	33
Abb. 8: Einfluss von ansteigender Kompressionsstärke auf den GAG-Verlust.....	34
Abb. 9: Einfluss von IL-1 und Kompression auf den GAG-Verlust.....	35
Abb. 10: Einfluss von Antioxidantien und Kompression auf den GAG-Verlust.....	36
Abb. 11: Einfluss von ansteigender Kompressionsstärke auf die NO-Freisetzung	37
Abb. 12: Einfluss von IL-1 und Kompression auf die NO-Freisetzung	38
Abb. 13: Einfluss von Antioxidantien und Kompression auf die NO-Freisetzung	39
Abb. 14: Einfluss steigender Kompressionsstärke auf die mRNA-Expression von MMP-2, -3, -9 und 13	40
Abb. 15: Einfluss steigender Kompressionsstärke auf die mRNA Expression von ADAMTS-4 und ADAMTS-5.....	41
Abb. 16: Einfluss von IL-1 und Kompression auf die mRNA-Expression von MMP-1, -2, -3, -9, -13, ADAMTS-4 und -5 sowie Aggrekan und Kollagen Typ II.....	42

Abb. 17: Einfluss von Antioxidantien und Kompression auf die mRNA-Expression von MMP-2, -3, -9 und -13.....	44
Abb. 18: Einfluss von Antioxidantien und Kompression auf die mRNA-Expression von ADAMTS-4 und ADAMTS-5.....	45
Abb. 19: Einfluss von Kompression und Antioxidantien auf die Aktivität der Laktatdehydrogenase	46
Abb. 20: Mikroskopische Darstellung von Zellkernen im Meniskusgewebe in der TUNEL-Färbung	47
Abb. 21: Einfluss von Kompression und Antioxidantien auf die Zellvitalität	48

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Übersicht über die Zusammensetzung von Meniskus- und Gelenkknorpelgewebe ...	3
Tab. 2: Übersicht über die an der Knorpeldegeneration beteiligten MMPs	9
Tab. 3: Übersicht über die an der Knorpeldegeneration beteiligten Aggrekanasen	11
Tab. 4: Übersicht die bei der real time RT-PCR verwendeten Primer.....	26
Tab. 5: Übersicht über den real time RT-PCR Zyklus.....	27

1. Einleitung

1.1. Allgemeines

Gelenkerkrankungen und ihre Folgen haben für die Gesellschaft einen sehr hohen medizinischen und ökonomischen Stellenwert. Mobilität bis in das hohe Alter bedeutet mehr Lebensqualität und diese kann nur durch einen gesunden, funktionierenden Bewegungsapparat gewährleistet bleiben. Gelenkerkrankungen sind jedoch keine alleinige Erkrankung der Älteren, denn durch Unfälle, z.B. beim Sport, wo Meniskusverletzungen zu den häufigsten Verletzungen am Bewegungsapparat gehören, können schon in jungen Jahren die Weichen für spätere degenerative Folgen gestellt sein. Der Anspruch an eine Therapie, die diese Lebensqualität erhält und somit auch der Stellenwert für die Medizin, haben in den letzten Jahren stetig zugenommen.

Die Weltgesundheitsorganisation (WHO) hat das erste Jahrzehnt dieses Jahrtausends zur "Bone and Joint Decade" erklärt, was die steigende Bedeutung eines gesunden Bewegungsapparats verdeutlicht.

1.1.1. Anatomie und Funktion der Kniegelenksmenisken

Im Kniegelenk artikulieren die beiden Femurkondylen mit den Gelenkflächen des Tibiakopfes. Die beiden Menisken vergrößern dabei die Kontaktfläche zwischen den stark konvexen Femurkondylen und dem flachen Tibiaplateau. Die proximale Oberfläche der Menisken ist konkav und somit an die Form der Kondylen adaptiert. Die Unterseite ist flach, liegt dem Tibiaplateau auf und ist mit diesem durch Ligamente verbunden. Im Querschnitt erscheinen die Menisken keilförmig und sind mit der äußeren Zirkumferenz an der Gelenkkapsel befestigt. Der mediale Meniskus ist halbmondförmig und, zusätzlich zu seinen ligamentären Verbindungen zum Tibiaplateau, mit dem medialen Kollateralband verwachsen (**Abb. 1**). Diese Verbindung besitzt der kreisförmige und größere laterale Meniskus nicht, was ihm mehr Bewegungsfreiheit ermöglicht. Daraus resultiert jedoch auch eine erhöhte Verletzungsanfälligkeit des medialen im Vergleich zum lateralen Meniskus.

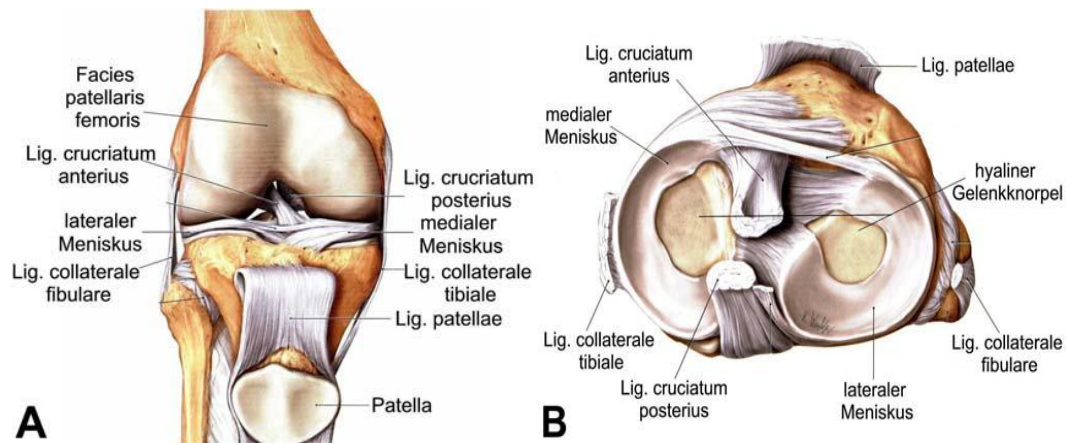


Abb. 1: Schematische Darstellung zur Lage der Menisken im Kniegelenk (A) sowie des Tibiaplateaus mit den aufliegenden Menisken nach Entfernung des Femurs (B)
(Schünke et al. 2005)

Die Menisken funktionieren im Kniegelenk als transportable Gelenkflächen. Sie reduzieren bei Belastung des Kniegelenks den auf das Tibiaplateau wirkenden Druck, stabilisieren das Gelenk und unterstützen die Lubrikation (Fithian et al. 1990; Ghosh et al. 1987; Walker et al. 1975). Die im Knie auftretenden axial wirkenden Kräfte werden zu 45% bis 75% über die Menisken übertragen (Ahmed et al. 1983). Eine teilweise Meniskusentfernung reduziert die druckübertragende Kontaktfläche im Knie nur um 10% und führt aber zu einer Steigerung des auf die tibiale Gelenkfläche wirkenden Drucks um 65%. Eine totale Entfernung verringert die kraftübertragende Fläche sogar um 50% bis 70% und der maximale Druck auf das Tibiaplateau wird mehr als verdoppelt (Baratz et al. 1986). Dieses verdeutlicht die enorme Bedeutung der Menisken als Gleitfläche und Druckdämpfung für eine physiologische Funktion des Kniegelenkes.

1.1.2. Histologie des Meniskusgewebes

Das faserknorpelige Gewebe der Menisken besteht aus einem, im Vergleich zum hyalinen Knorpel geringen Anteil an Zellen und einem Großteil extrazellulärer Matrix (EZM). Es setzt sich zu 70% aus Wasser und zu 30% aus organischem Material zusammen, welches wiederum zu 70% von Kollagen gebildet wird (McDevitt et al. 1990; Herwig et al. 1984). Die Dominanz von Kollagen Typ-I im Meniskus ist ein entscheidender Unterschied zum hyalinen Gelenkknorpel, in dem Typ-II Kollagen überwiegt (Fithian et al. 1990; McDevitt et al. 1990; Herwig et al. 1984) (**Tab. 1**).

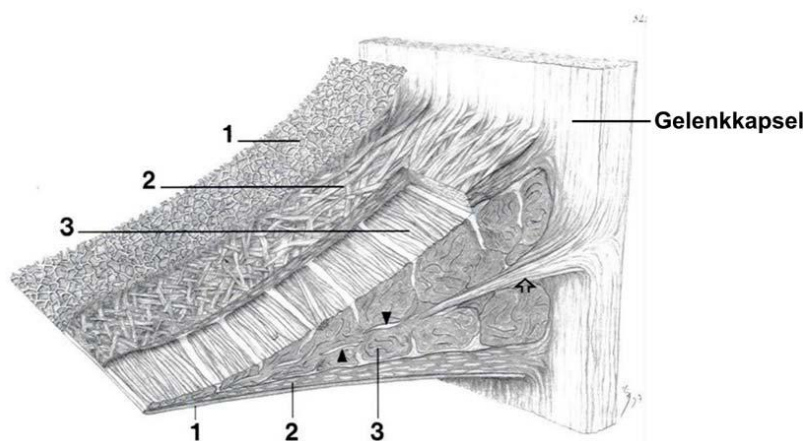
Tab. 1: Übersicht über die Zusammensetzung von Meniskus- und Gelenkknorpelgewebe

Verändert nach (AufderHeide et al. 2004)

	häufigster Kollagen-Typ	Kollagene*	Wasseranteil	Proteoglykane*
Meniskus	Typ I	60-70%	72%	1-3%
Gelenkknorpel	Typ II	50-73%	75-80%	15-25%

* = % des Trockengewichts

Das Meniskusgewebe lässt sich in einem Querschnitt in drei Schichten unterscheiden (**Abb.2**). Die Oberfläche der Menisken besteht aus einem Netz feiner Kollagenfibrillen. Die zweite Schicht wird von Lamellenartigen sich überkreuzenden Faserbündeln gebildet und in der Tiefe finden sich überwiegend zirkulär angeordnete, dicke Kollagenbündel die von Bindegewebssepten unterbrochen und durch radiär verlaufende Bündel verstärkt werden (Petersen et al. 1999; Fithian et al. 1990; Wagner. 1976; Bullough et al. 1970). Die Kollagenfasern verleihen dem Meniskusgewebe seine außerordentliche Reißfestigkeit.

**Abb. 2: Schematische Darstellung des Kollagenfasergerüsts im Meniskus**

Die Oberfläche der Menisken besteht aus einem Netz feiner Kollagenfibrillen (1), während die zweite Schicht von lamellenartigen kreuzenden Faserbündeln gebildet wird (2). In der Tiefe finden sich überwiegend zirkulär angeordnete dicke Kollagenbündel, die von Bindegewebssepten durchzogen (Pfeile) und durch einzelne, radiär verlaufende Bündel verstärkt werden (3) (Petersen et al. 1998).

Die Versorgung der Menisken mit Blut ist uneinheitlich und altersabhängig. Während beim Neugeborenen noch ein Großteil des Meniskus von Gefäßen durchzogen ist, ist bei der Skelett reife nur noch das äußere Drittel, die sogenannte „Red Zone“ vaskularisiert. Die inneren zwei Drittel sind nicht mit Gefäßen versorgt und werden durch Diffusion über die Synovialflüssigkeit ernährt (Petersen et al. 1999; Benedetto et al. 1985; Day et al. 1985).

Daraus resultieren schlechtere Heilungserfolge bei Meniskusverletzungen in den avaskulären Gebieten (Hennerbichler et al. 2007^(c); Heckmann et al. 2006).

Ein wichtiger Bestandteil der EZM im Meniskus- und Gelenkknorpelgewebe sind die Proteoglykane. Es sind hydrophile Makromoleküle die aufgrund ihrer negativ geladenen Polysaccharidseitenketten, bis zum 50-fachen ihres Gewichts an Wasser binden können. Sie machen 1-3% des Trockengewichts der Menisken aus und bestehen aus Glykosaminoglykan (GAG) Seitenketten, die kovalent an ein Kernprotein gebunden sind (McDevitt et al. 1990; Adams et al. 1981). Das Kernprotein Aggrekan mit seinen GAG-Seitenketten ist das häufigste Proteoglykan im Knorpelgewebe (Hardingham et al. 1995). Im Meniskusgewebe werden die Proteoglykane von den Faserknorpelzellen synthetisiert und sind in dem Netzwerk von Kollagenfasern verankert. Bei Kompression wird das gebundene Wasser zunehmend verdrängt und es baut sich ein hydrostatischer Druck auf, da das Wasser aufgrund von Reibungskräften nur schwer aus dem Gewebe austreten kann. Dieser Vorgang wirkt einer weiteren Kompression entgegen.

Diese biomechanischen Eigenschaften verleihen dem Knorpel und Meniskusgewebe die wichtige Fähigkeit Druck auszugleichen (Mow et al. 1984). Der Gehalt an Proteoglykanen ist am höchsten in den inneren Dritteln des Meniskus, den Orten der maximalen Druckbelastung. Er nimmt mit dem Alter ab, was die Menisken anfälliger für Verletzungen macht (Karube et al. 1982; Adams et al. 1981). Veränderungen in der Zusammensetzung der EZM beeinflussen die biomechanischen Eigenschaften des Gewebes und können langfristig zur Degeneration von Gelenkknorpel und Meniskus führen (Mort et al. 2001).

1.2. Ursachen für Meniskusschäden

Schäden am Meniskus können traumatische und degenerative Ursachen haben (Hough, Jr. et al. 1990). Verletzungen kommen häufig bei jüngeren, sportlich aktiven Menschen vor und treten durch mechanische Überlastungen im Kniegelenk z.B. bei Stürzen mit hoher Druck und Drehbelastung im Kniegelenk auf. Hierbei kommt es durch die auftretenden Druck und Scherkräfte zu Rissen in den Menisken.

Zu degenerativen Schädigungen der Menisken kommt es unter anderem durch pathologisch veränderte Beinachsen (O- und X-Beine) oder Übergewicht und der daraus resultierenden stetigen mechanischen Überlastung des Meniskusgewebes. Degenerative Erkrankungen wie die Osteoarthritis, die im Verlauf zu chronischen Entzündungszuständen und dem Abbau von Gelenkknorpel im Knie führen sind dabei häufig mit degenerativen oder traumatischen Veränderungen der Menisken verbunden (Chan et al. 2008; Hough, Jr. et al. 1990).

1.2.1. Einfluss von Interleukin-1 auf Meniskus und Gelenkknorpel

Zytokine sind Proteine die in entzündlichen und immunologischen Prozessen eine entscheidende Rolle bei Zell-Zell-Interaktionen spielen. Sie werden unter anderem in pro- und antiinflammatorisch wirkende Zytokine unterschieden und es hat sich bei Untersuchungen zur Pathogenese der Osteoarthritis gezeigt, dass die entzündungsfördernden, katabol wirkenden Zytokine (v.a. Interleukin-1 und Tumor Nekrose Faktor α) in der Synovialflüssigkeit von Patienten mit Osteoarthritis in erhöhten Konzentrationen nachgewiesen werden können (Westacott et al. 1990).

Bei entzündlichen Prozessen in Gelenken wird IL-1 von einer Vielzahl von Zellen (Makrophagen, Granulozyten, Chondrozyten, Synovialozyten) sezerniert und es wurde nachgewiesen, dass IL-1 am Fortschreiten der Knorpeldegeneration bei der Osteoarthritis beteiligt ist (van de Loo et al. 1995). Vor allem die Proteoglykan- und Kollagensynthese im Knorpelgewebe sind unter Einfluss von IL-1 vermindert (Huch et al. 1997; Goldring et al. 1987).

Die Produktion von Stickoxid (s. 1.2.2) wird durch IL-1 stark gesteigert (Stadler et al. 1991) und die Knorpelzellen synthetisieren verstärkt Proteinase (s. 1.2.3, 1.2.4), die Bestandteile der EZM spalten können (Koshy et al. 2002; Little et al. 1999; Martel-Pelletier et al. 1991). Der Großteil der publizierten Untersuchungen befasst sich mit dem Einfluss von IL-1 auf den Gelenkknorpel während die Wirkung auf Meniskusgewebe weitgehend unerforscht ist.

Die verfügbaren Arbeiten lassen jedoch vermuten, dass das Meniskusgewebe auf eine Stimulation mit Interleukin-1 zumindest ähnlich reagiert wie der Gelenkknorpel. So wird auch im Meniskus eine vermehrte Spaltung und Freisetzung der, für die Stabilität der EZM so wichtigen Proteoglykane unter Einfluss von IL-1 beschrieben (Shin et al. 2003). Weiterhin zeigten LeGrand et al. (2001) an Meniskusexplantaten, dass eine Stimulation mit IL-1 wie im Gelenkknorpel zu einer vermehrten Produktion von NO (s. 1.2.2) führt. Hinweise aus neueren Arbeiten lassen außerdem vermuten, dass eine erhöhte Konzentration von IL-1 in vitro die Regenerationsvorgänge im Meniskus nach einer Verletzung zu beeinträchtigen scheint (Wilusz et al. 2008; Hennerbichler et al. 2007^(b)).

1.2.2. Auswirkung von oxidativem Stress auf Meniskus und Gelenkknorpel

NO zählt zu den reaktiven Sauerstoffmolekülen ("reactive oxygen species", ROS). Es erfüllt verschiedene physiologische Aufgaben in der Signaltransduktion, ist in pathologisch erhöhten Konzentrationen aber auch für "oxidativen Stress" mitverantwortlich, der das oxidative Gleichgewicht in der Zelle stören kann. NO ist als Mediator an der bei der Osteoarthritis auftretenden Knorpeldestruktion beteiligt (Henrotin et al. 2005; Lotz. 1999) und ist hierbei auch in der Synovialflüssigkeit vermehrt nachweisbar (Karan et al. 2003).

Hohe Konzentrationen von NO werden für die Hemmung der Proteoglykan- und Kollagensynthese (Hauselmann et al. 1994) sowie die Induktion von matrixdegradierenden Enzymen im Knorpelgewebe verantwortlich gemacht (Sasaki et al. 1998; Murrell et al. 1995). Desweiteren kommt es durch erhöhte NO-Konzentration bei Chondrozyten zu einem Rückgang der Zellproliferation und zur Induktion von Apoptose (Blanco et al. 1995).

NO ist außerdem ein wichtiger Bestandteil der Signalkaskade von Interleukin-1. IL-1 bewirkt sowohl im Gelenkknorpel als auch im Meniskusgewebe eine Aktivierung der induzierbaren Stickstoffsynthase (iNOS) wodurch vermehrt NO gebildet wird (Shin et al. 2003; Hashimoto et al. 1999; Cao et al. 1998; Stadler et al. 1991).

Die meisten vorliegenden Arbeiten befassen sich mit der Wirkung von NO im Gelenkknorpel, während die Vorgänge in Meniskusgewebe bisher wenig untersucht sind. Bei Patienten mit Meniskusrissen konnten erhöhte NO-Konzentrationen in der Synovialflüssigkeit nachgewiesen werden. Es ist beschrieben, dass die NO-Produktion in den inneren, mechanisch stärker beanspruchten Anteilen der Menisken höher ist als in der äußeren Region (Hennerbichler et al. 2007^(a)). Untersuchungen zum Einfluss mechanischer Kompression auf Meniskusgewebe an verschiedenen in vitro Modellen haben gezeigt, dass mechanische Belastung die NO-Synthese im Meniskus zu verstärken scheint (Gupta et al. 2008; Fink et al. 2001). Hashimoto et al. (1999) zeigten am Tiermodell, dass bei Osteoarthritis sowohl die NO-Produktion als auch die Apoptoserate im Meniskusgewebe erhöht sind. Ähnliche Ergebnisse konnten am Tiermodell auch durch partielle Meniskektomie induziert werden (Kobayashi et al. 2001).

Um den auftretenden schädlichen oxidativen Stress zu regulieren, produzieren Zellen antioxidative Enzyme. In Chondrozyten kommen hauptsächlich die Katalase, Glutathionperoxidase und verschiedene Formen der Superoxiddismutase als antioxidativ wirksame Enzyme vor (Grazioli et al. 1998). In der Gelenkflüssigkeit von Patienten mit Osteoarthritis wurden verringerte Konzentrationen der Superoxiddismutase gemessen (Regan et al. 2008).

Die Ergebnisse aus mehreren Untersuchungen weisen darauf hin, dass Antioxidantien im Gelenkknorpel und anderen Gewebetypen den programmierten Zelltod hemmen können (Dave et al. 2008; Ohyama et al. 2001; Malassagne et al. 2001; Sandstrom et al. 1994).

Da für das Meniskusgewebe noch wenig über die Wirkungen von Antioxidantien bekannt ist, wurde in dieser Arbeit der Einfluss von zwei Modellsubstanzen in Kombination mit verletzender Kompression untersucht.

MnTMPyP (Manganese(III)tetrakis 1-methyl-4-pyridyl Porphyrin Pentachlorid, SOD) ist ein Molekül mit einer der Superoxiddismutase ähnlichen Funktion (Gardner et al. 1996; Faulkner et al. 1994). Kurz et al. (2004) konnten am Gelenkknorpel einen durch verletzende Kompression induzierten Zelluntergang durch Zusatz von SOD wirksam hemmen.

Auch für N-Acetyl-Cystein (NAC) ist eine antiapoptotische Wirkung im Knorpelgewebe beschrieben (Martin et al. 2004). Beecher et al. (2007) zeigen, dass ein Zelluntergang, der durch mechanische Kompression induziert wurde, durch beide Substanzen vermindert werden kann.

1.2.3. Funktion und Induktion der Matrixmetalloproteinasen

Die Matrixmetalloproteinasen (MMPs), von denen über 20 Typen beim Menschen bekannt sind, gehören zur Familie der Zink und Calcium abhängigen Endopeptidasen (Malemud. 2006). Endopeptidasen spalten enzymatisch Peptidbindungen innerhalb von Proteinen und sind meist spezifisch für bestimmte Aminosäuren. Unter physiologischen Bedingungen sind sie an Abbau- und Umbauprozessen unter anderem bei der Embryonalentwicklung, Zellproliferation und Migration, Osteogenese, Angiogenese und Wundheilung beteiligt (Nagase et al. 2006; Visse et al. 2003). Im Knorpel gelten die MMPs mit den Aggrekanasen als hauptverantwortliche Enzyme für Umsatz der Proteoglykane und Kollagene in der EZM (Mort et al. 2001). Sie werden nach ihrer Substratspezifität in vier Klassen eingeteilt (**Tab. 2**): Kollagenasen (MMP-1, 8, 13, 18), Gelatinasen (MMP-2 und 9), Stromelysine (MMP-3, 10, 11) und membrangebundene MMPs (u.a. MMP-14, -15, -16 und -17) (Nagase et al. 2006).

Die meisten MMPs werden in den Extrazellularraum synthetisiert, aber einige wie z.B. MMP-1, -2, und -11 wurden auch intrazellulär nachgewiesen und können mit anderen intrazellulären Proteinen interagieren (Limb et al. 2005; Kwan et al. 2004; Luo et al. 2002). Die Synthese der MMPs erfolgt zunächst als inaktive Vorstufen (Zymogene, pro-MMPs) mit einem durch eine Cystein-Zink-Verbindung fixierten Propeptid.

Die Aktivierung erfolgt über komplexe, intermolekulare, proteolytische Kaskaden die diese Verbindung destabilisieren, was schließlich zur Abspaltung des Propeptids führt (Springman et al. 1990).

Die Zymogene der meisten MMPs werden in vivo von anderen Proteinasen (Serinproteinasen, Cysteinproteinasen, MMPs) durch proteolytische Spaltung aktiviert. So kann z.B. aktives MMP-3 die inaktiven Vorstufen von MMP-1 und MMP-13 aktivieren (Murphy et al. 1987). In vitro konnten MMPs durch verschiedene Substanzen (z.B. Quecksilberverbindungen, Phorbolester, Harnstoff, reaktive Sauerstoffmoleküle) sowie physikalische Reize wie z.B. Hitze und UV-Strahlung in die aktive Form überführt werden (Nagase. 1997).

Die Regulation der MMP-Expression auf mRNA-Ebene erfolgt durch inflammatorische Zytokine (IL-1, TNF- α), Wachstumsfaktoren und Hormone (Benbow et al. 1997). Spezifische endogene Inhibitoren (TIMPs, „tissue inhibitors of metalloproteinases“) hemmen die Aktivität der MMPs in vivo (Baker et al. 2002).

Tab. 2: Übersicht über die an der Knorpeldegeneration beteiligten MMPs

Verändert nach (Somerville et al. 2003)

Name	MMP	Substrate	Aktivierung
Kollagenasen			
Kollagenase-1	MMP-1	Kollagen Typ I, II, III, VII, VIII, X, Gelatine, Aggrekan, Versikan, Link-Protein, Casein	pro-MMP-2, -9
Kollagenase-2	MMP-8	Kollagen Typ I, II, III, VII, VIII, X, Gelatine, Aggrekan, Versikan, Casein	pro-MMP-8
Kollagenase-3	MMP-13	Kollagen Typ I, II, III, VII, VIII, X, Gelatine, Aggrekan, Versikan, Casein	pro-MMP-9, -13
Gelatinasen			
Gelatinase-A	MMP-2	Kollagen Typ I, II, III, IV, V, VII, X, XI, XIV, Gelatine, Aggrekan, Link-Protein, Versikan, Decorin	pro-MMP-9, -13
Gelatinase-B	MMP-9	Kollagen Typ IV, V, VII, X, XIV, Gelatine, Aggrekan, Versikan, Link-Protein	pro-MMP-9, -13
Stromelysin			
Stromelysin-1	MMP-3	Kollagen Typ II, III, IV, IX, X, XI, Gelatine, Aggrekan, Casein, Decorin, Versikan	pro-MMP-1, -7, -8, -9, -13
Membrangebundene MMPs			
MT1-MMP	MMP-14	Kollagen Typ I, II, III, Gelatine, Aggrekan, Dermatan-sulfat	pro-MMP-2, -13
MT2-MMP	MMP-15	Kollagen Typ I, II, III, Gelatine, Aggrekan	pro-MMP-2, -13
MT3-MMP	MMP-16	Kollagen I, III, Gelatine, Aggrekan, Casein	pro-MMP-2
MT4-MMP	MMP-17	Gelatine	

Die Kollagenasen spalten fibrilläres Kollagen (Typ I, II, III) in ihrer tripel-helikalen Domäne an spezifischen Stellen (Chung et al. 2000). Die so entstandenen Fragmente weisen Gelatineverbindungen auf, die von den Gelatinasen weiter gespalten werden können (Mort et al. 2001).

Die membrangebundenen MMPs sind in der Membran fixiert (Nagase et al. 2006), spielen eine wichtige Rolle bei der Aktivierung von anderen MMPs wie MMP-2 (Visse et al. 2003), können aber auch selbst Kollagene und andere Matrixkomponenten spalten (Ohuchi et al. 1997).

Bei pathophysiologischen Prozessen im Rahmen der Osteoarthritis kann es zu einem Ungleichgewicht zwischen MMPs und ihren Inhibitoren kommen, was zu einer erhöhten Aktivität der MMPs und zu einem vermehrten Abbau der EZM führt (Pelletier et al. 1990; Dean et al. 1989). Bei der Osteoarthritis wird eine verstärkte Aktivität von MMPs korrelierend mit einer Matrixdegradation im Knorpelgewebe beobachtet (Murphy et al. 2008; Burrage et al. 2007). MMP-13 dessen Expression in arthrotisch verändertem Knorpel stark erhöht ist (Billinghurst et al. 1997) kann eine 10-fach stärkere Zerstörung von Kollagen Typ II bewirken als MMP-1 (Mitchell et al. 1996).

Bei entzündlichen Gelenkerkrankungen ist auch die Expression der Gelatinasen MMP-2 und -9 gesteigert (Duerr et al. 2004; Mohtai et al. 1993). Im Tiermodell hat sich gezeigt, dass durch Blockade der Expression von MMP-3 die Knorpelschäden im Verlauf der Osteoarthritis geringer sind (Blom et al. 2007). Aus mehreren in vitro Untersuchungen ist weiterhin bekannt, dass durch Interleukin-1 eine vermehrte Expression von MMP-1, -3, -9 und -13 induziert werden kann (Aida et al. 2005; Fahmi et al. 2001; Flannery et al. 1999; Lefebvre et al. 1991).

Für das Meniskusgewebe haben sich mit dem Knorpel teils vergleichbare Eigenschaften gezeigt (Bluteau et al. 2001). McNulty et al. (2008) zeigen, dass eine generelle Hemmung der MMPs die Regeneration des Meniskusgewebes nach einer Verletzung positiv zu beeinflussen scheint. Des Weiteren kann eine mechanische Überlastung eine vermehrte Expression von MMPs sowohl im Gelenkknorpel als auch im Meniskusgewebe induzieren (s. 1.2.5).

1.2.4. Funktion und Induktion der Aggrekanasen

Die Aggrekanasen gehören wie die MMPs zu der Gruppe der zinkabhängigen MMPs. 1999 wurden die Enzyme Aggrekanase-1 und -2 die heute als ADAMTS-4 und -5 ("a disintegrin and a metalloproteinase domain with thrombospondin motifs") bezeichnet werden von einer Arbeitsgruppe bei DuPont entdeckt (Tortorella et al. 1999; Abbaszade et al. 1999) (**Tab. 3**). Die Aggrekanasen werden wie die MMPs als Zymogene (z.B. pro ADAMTS-5) mit einer inaktivierenden Domäne synthetisiert. Die Aktivierung erfolgt wahrscheinlich noch intrazellulär durch Abspaltung der pro-Domäne durch verschiedene Proprotein-Konvertasen (Furin, PACE4, PC5/6) sowie durch MMP-9 (Longpre et al. 2008; Malfait et al. 2008; Tortorella et al. 2005).

Im Knorpel konnte bisher eine Aktivität der Aggrekanasen ADAMTS-1, -4 und -5 nachgewiesen werden (Flannery et al. 1999) und auch im Meniskus wurde eine Aktivität von ADAMTS-4 und -5 festgestellt (Bluteau et al. 2001). Da Aggrekan den größten Anteil der Proteoglykane im Knorpelgewebe ausmacht, wird den Aggrekanasen ein maßgeblicher Anteil am Abbau der EZM in Knorpelgeweben zugeschrieben (Hardingham et al. 1995).

Tab. 3: Übersicht über die an der Knorpeldegeneration beteiligten Aggrekanasen

(Nagase et al. 2003)

Name	ADAMTS	Substrate
Aggrekanase-1	ADAMTS-4	Aggrekan, Brevikan, Vesikan
Aggrekanase-2	ADAMTS-5	Aggrekan

Der Unterschied zu den MMPs (s. **1.2.3**) ist, dass die Aggrekanasen vorwiegend das Kernprotein Aggrekan mit seinen GAG-Seitenketten spalten (Porter et al. 2005; Nagase et al. 2003). Auch die MMPs spalten Aggrekanmoleküle, jedoch an anderen charakteristischen Aminosäurepositionen (u.a. G1-VDIPEN³⁴¹), als die Aggrekanasen (u.a. G1-NITEGE³⁷³). Durch Markierung dieser sogenannten NITEGE-Fragmente mit Antikörpern ist eine Unterscheidung der Spaltprodukte möglich. Sowohl im Knorpel als auch in der Synovialflüssigkeit von Patienten mit Osteoarthritis wurden erhöhte Konzentrationen dieser spezifischen Spaltprodukte gefunden (Lark et al. 1997; Lohmander et al. 1993; Sandy et al. 1992).

Mehrere Untersuchungen weisen darauf hin, dass den Aggrekanasen eine entscheidende Bedeutung bei der Degeneration von Gelenkknorpel im Rahmen der Osteoarthritis zukommt (Sandy. 2005; Lohmander et al. 1993). Es gibt hier jedoch unterschiedliche Erkenntnisse über die degenerative Potenz der beiden Typen sowie ihre Induktion in Geweben verschiedener Spezies (Huang et al. 2008; Nagase et al. 2003).

Eine Aktivität von ADAMTS-4 und -5 konnte auch im Meniskus nachgewiesen werden und es gibt Hinweise darauf, dass ihre Expression mit der im Gelenkknorpel vergleichbar ist (Zielinska et al. 2008; Bluteau et al. 2001). Die vorliegende Arbeit soll dahingehend eine weitere Orientierung zur Aktivität und Induktion der Aggrekanasen in bovinem Meniskusgewebe liefern.

1.2.5. Einfluss von mechanischer Überlastung auf Meniskus und Gelenkknorpel

Die Menisken und der Gelenkknorpel im Kniegelenk sind im Alltag kontinuierlich mechanischer Beanspruchung ausgesetzt. Diese Belastung ist essentiell für die Ernährung und Vitalität des Gewebes, so lange sie im physiologischen Rahmen bleibt (Slowman et al. 1986). Bleibt diese Belastung z.B. durch Immobilisation aus, kann dies zur Atrophie des Gelenkknorpels führen (Behrens et al. 1989). Mechanische Überlastung führt jedoch zu Gewebsschäden und initiiert eine Degeneration des Knorpels. Diese Überlastung kann kontinuierlich durch Übergewicht einwirken (Gelber et al. 1999; Davis et al. 1989) oder aus einer veränderten Gelenkgeometrie (Murphy et al. 1995) resultieren. Weiterhin können Gelenkverletzungen z.B. bei Sportunfällen die Entstehung einer degenerativen Gelenkerkrankung im Verlauf begünstigen (Gelber et al. 2000).

Im Meniskus führt sowohl eine direkte traumatische aber auch eine langfristige Überlastungen häufig zu Rissen im Gewebe. Eine solche Schädigung der Menisken kann zu einer begleitenden Degeneration des Gelenkknorpels führen und kann so die Entwicklung einer Osteoarthritis begünstigen (Christoforakis et al. 2005; Berthiaume et al. 2005).

Die besonderen biomechanischen Eigenschaften von Knorpel und Meniskusgewebe sind abhängig von der Zellvitalität. Im Knorpel und insbesondere im Meniskusgewebe haben die Zellen nur einen sehr geringen Anteil am Gewebesvolumen. Da aber die Zellen für die Biosynthese der EZM verantwortlich sind, ist anzunehmen, dass der Zelltod eine wichtige Rolle in der Pathogenese von degenerativen Gelenkerkrankungen spielt. Bei Patienten mit Osteoarthritis tritt vermehrt Apoptose im Gelenkknorpel auf (Hashimoto et al. 1998) und auch in anderen Arbeiten wird dem Untergang von Chondrozyten eine kausale Rolle bei der Entstehung der Osteoarthritis zugeschrieben (Hashimoto et al. 1998; Blanco et al. 1998). Hashimoto et al. (1999) konnten diesen Zusammenhang auch am Meniskusgewebe im Rahmen einer künstlich induzierten Osteoarthritis im Tiermodell zeigen.

Die genauen Mechanismen, die nach einer Verletzung zu der anschließenden fortschreitenden Degeneration führen sind besonders für das Meniskusgewebe im Detail noch nicht zufriedenstellend erklärbar.

Durch verletzende mechanische Kompression ließen sich in mehreren in vitro Modellen erhöhte Apoptoseraten im Gelenkknorpel induzieren (Kurz et al. 2004; Patwari et al. 2004; Chen et al. 2001; Loening et al. 2000; Quinn et al. 1998), was für einen Zusammenhang zwischen mechanischem Stress, dem daraus folgenden Zelluntergang und der Entwicklung einer Osteoarthritis spricht.

Des Weiteren ist das Verständnis der Mechanismen des in der Pathogenese der Osteoarthritis verstärkten Abbaus der EZM im Gelenkknorpel- und Meniskusgewebe von entscheidender Bedeutung um therapeutische Interventionen gegen diese Krankheit zu entwickeln.

Es hat sich gezeigt, dass Gelenkknorpel im Anschluss an eine verletzende Kompression vermehrt matrix-degradierende Enzyme exprimiert (Patwari et al. 2001) und die umgebende Matrix in verstärktem Maß abgebaut wird (Quinn et al. 1998). Vor allem für MMP-3 wurde eine erhöhte Expression auf mRNA-Ebene nach mechanischer Verletzung festgestellt (Lee et al. 2005; Patwari et al. 2003), aber auch eine vermehrte Expression von MMP-1, -9, -13 und ADAMTS-5 konnte durch eine verletzende Kompression induziert werden (Lee et al. 2005). Zielinska et al. (2008) bewirkten durch eine zweistündige mechanische Kompression von Meniskusexplantaten um 10% und 20% ihrer Dicke mit einer Frequenz von 1 Hz, eine Zunahme in der Expression von MMP-1, -3, -13 und ADAMTS-4.

Die biomechanischen Eigenschaften und insbesondere die Kompressionsfestigkeit des Knorpel und Meniskusgewebes sind vom GAG-Gehalt der EZM abhängig (Patwari et al. 2000). Untersuchungen am Gelenkknorpel haben einen durch mechanische Verletzung induzierbaren GAG-Verlust in das Kulturmedium bzw. eine Abnahme des GAG-Gehaltes im Gewebe gezeigt (DiMicco et al. 2004; Kurz et al. 2001; Quinn et al. 2001). Des Weiteren bestätigen Untersuchungen an Explantaten diese Erkenntnisse auch für das Meniskusgewebe (McHenry et al. 2006; Shin et al. 2003).

Der Zusammenhang von mechanischer Verletzung und entzündlichen Prozessen ist ein weiterer Aspekt, der für Pathologie der Osteoarthritis von Bedeutung ist. Verglichen mit einer reinen Verletzung hat der Zusatz von IL-1 und TNF- α beim Knorpel einen signifikant erhöhten GAG-Verlust ergeben (Patwari et al. 2003). Stevens et al. (2009) zeigten an Gelenkknorpel mit dem gleichen in vitro Modell zur verletzenden Kompression, das auch in der vorliegenden Arbeit verwendet wurde, eine Induktion der Expression von MMP-1, -3, und -9 sowohl durch die Kompression als auch durch Zusatz von IL-1. Mehrere Untersuchungen liefern Hinweise darauf, dass eine mechanische Kompression in vitro die NO-Produktion im Knorpel- und Meniskusgewebe erhöht (Fermor et al. 2004; Lee et al. 2002; Fink et al. 2001; Das et al. 1997). Gupta et al. (2008) zeigten außerdem, dass durch mechanische Kompression die Synthese von IL-1 und der, für die NO-Produktion verantwortlichen, iNOS gesteigert werden können. Der Großteil der verfügbaren Untersuchungen bezieht sich auf Gelenkknorpel, während Erkenntnisse zu Meniskusgewebe bisher nur unzureichend vorhanden sind.

1.3. Zielsetzung der Arbeit

Die biochemischen und zellbiologischen Mechanismen, die die Degeneration des Meniskusgewebes zur Folge haben können, sind bislang nur in Ansätzen bekannt. Es gibt Erkenntnisse, dass neben direkter mechanischer Belastung auch Mediatoren wie NO und proinflammatorische Zytokine, wie IL-1, das Meniskusgewebe schädigen und die Regeneration negativ beeinflussen können. Es ist daher von hoher klinischer Bedeutung, diese Pathomechanismen, die der Destruktion des Meniskusgewebes zugrunde liegen, weitgehend zu erforschen und die Reaktionen des Gewebes auf mechanische Verletzungen zu untersuchen.

In der vorliegenden Arbeit wurde ein in vitro Modell angewendet, mit dessen Hilfe der Einfluss einer einmaligen mechanischen Kompression, die eine Verletzung des Gewebes induziert, auf bovines Meniskusgewebe einer definierten Form und Größe untersucht werden kann. Das Kompressionsmodell wurde zusammen mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Alan J. Grodzinsky am Massachusetts Institute of Technology (MIT, Cambridge, USA) entwickelt (Frank et al. 2000) und auch in anderen Arbeiten zur verletzenden Kompression von Gelenkknorpel erfolgreich angewendet (Jones et al. 2009; Stevens et al. 2009; Lee et al. 2005; DiMicco et al. 2004). Der grundlegende Versuchsaufbau geht aus Ergebnissen zu verletzender mechanischer Kompression von bovinem Gelenkknorpel (Arbeitsgruppe Prof. Dr. Dr. Schünke / Prof. Dr. Kurz, Anatomisches Institut der Christian-Albrechts-Universität Kiel) hervor (Kurz et al. 2005; Kurz et al. 2004). Die dort verwendeten Parameter führten zuverlässig zu einer verletzenden Kompression des Gelenkknorpels. Dieses führte im Folgenden zu einer vermehrten Freisetzung von GAG und NO in das Kulturmedium, zu einem vermehrten Zelluntergang sowie zu einer vermehrten Expression von matrixdegradierenden Enzymen.

Wie der Meniskus, als histologisch ähnliches, aber biomechanisch sehr unterschiedliches Gewebe, auf eine solche Verletzung reagiert und welchen Einfluss IL-1 darauf hat, soll in der vorliegenden Arbeit untersucht werden. Ein weiterer Aspekt ist eine mögliche Beeinflussung von degenerativen Prozessen durch die Antioxidantien SOD und NAC. Die Erkenntnisse aus den gewonnenen Daten sollen helfen die Vorgänge im Meniskusgewebe, die durch mechanischen Stress beeinflusst werden, besser zu verstehen und durch eine eventuelle Hemmung von degenerativen Prozessen Grundlagen für therapeutische Ansätze aufzuzeigen.

Hier ergeben sich besonders folgende Fragestellungen:

- Welche Auswirkungen hat eine verletzende Kompression auf den GAG-Verlust und die Produktion von NO?
- Wird die Expression von matrixdegradierenden Proteinasen (MMP-1, -2, -3, -9, -13, ADAMTS-4 und -5) sowie ihrer Substrate (Kollagen Typ II und Aggrecan) durch die Kompression beeinflusst?
- Wird die Vitalität der Zellen durch die mechanische Verletzung beeinträchtigt?
- Welche Wirkung hat ein Zusatz von IL-1 auf die untersuchten Faktoren?
- Lassen sich eventuell auftretende katabole und gewebeschädigende Veränderungen nach der verletzenden Kompression durch den Zusatz der Antioxidantien N-Acetyl-Cystein (NAC) und dem SOD-Mimetikum MnTMPyP (Manganese(III)tetrakis 1-methyl-4-pyridyl Porphyrin Pentachlorid) inhibieren?

2. Material und Methoden

2.1. Materialien

2.1.1. Chemikalien und Reagenzien

Produkt	Hersteller
Amphotericin	PAA
ApopTag® Peroxidase in situ	Chemicon, USA
Apoptosis Detection Kit	
Aqua dest.	Biochrom AG
Chloroform	Merck
Cytotoxicity Detection Kit	Roche
DMEM	Sigma
DMMB	Polysciences
Ethanol	Merck
Griess-Reagenz	Sigma
Hämatoxylin	Merck
HEPES	Biochrom AG
HBSS (Hanks Buffering Salt Solution)	Biochrom AG
Isopropylalkohol (2-Propanol)	Merck
Superoxiddismutasemimetikum (SOD, MnTMPyP)	Alexis Biochemicals, Grünberg
Methylbenzoat	Roth
Natrium-Chlorid	Roth
NaOH	Merck
NaNO ₂	Merck
N-Acetyl-Cystein	Sigma
Na-Pyruvat	Biochrom AG
Papain	Sigma
Paraformaldehyd	Merck
Paraplast (Paraffin)	Sherwood Medical, USA
PBS	Biochrom AG
Penicillin G	PAA
Prolin	Sigma

Qiagen QuantiTect® SYBR Green RT-PCR Kit	Qiagen, USA
Qiagen®One Step RT-PCR	Qiagen
Recombinant Human IL-1α	R & D Systems
RQ1 RNase-freie DNase	Promega
RQ1 DNase Stop Solution	Promega
Streptomycinsulfat	PAA
TaqMan®-Sonden	Applied Biosystems
Trizol	Invitrogen
Vitamin C	Sigma

2.1.2. Kulturbedingungen

Kulturmedium für Explantate:

DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium)

10 mM	HEPES
1 mM	Na-Pyruvat
0,4 mM	Prolin
50 µg/ml	Vitamin C
10.000 U/ml	Penicillin G
10 mg/ml	Streptomycinsulfat
25 µg/ml	Amphotericin

HBSS-Lösung mit Antibiotika:

HBSS (Hanks Buffering Salt Solution)

10.000 U/ml	Penicillin G
10 mg/ml	Streptomycinsulfat
25 µg/ml	Amphotericin

Inkubationsort:

Hereus Zellkulturschrank bei 37°C, 5% CO₂

2.1.3. Herstellung der bovinen Meniskusexplantate

Als Material für die durchgeführten Versuche, wurden Rindermenisken von Tieren (< 2 Jahren) aus einem konventionellen Schlachthof (Norddeutsche Fleischzentrale GmbH, Bad Bramstedt) verwendet. Einen Tag nach der Schlachtung der Tiere wurden die Kniegelenke zur Verfügung gestellt und bis zur Präparation bei 6-8°C gelagert. Die Menisken wurden unter sterilen Bedingungen aus den Kniegelenken entnommen und in die HBSS-Lösung mit Zusatz von Antibiotika (s. 2.1.2) überführt. Im Anschluss wurden mit einer Stanze mehrere Gewebezylinder mit einem Durchmesser von 10 mm aus den Menisken entnommen, wobei die peripheren, vaskularisierten Teile der Menisken, nicht verwendet wurden. Anschließend wurde von der Unterseite jedes Gewebezylinders eine 1 mm dicke Scheibe mit Hilfe eines Skalpells und einer Schablone abgetrennt. Aus diesen Scheiben wurden mit einer Biopsiestanze 4 - 5 Gewebescheiben (Explantate) mit einem Durchmesser von 3 mm gewonnen und in der vorliegenden Arbeit für die Untersuchungen verwendet (**Abb. 3**).

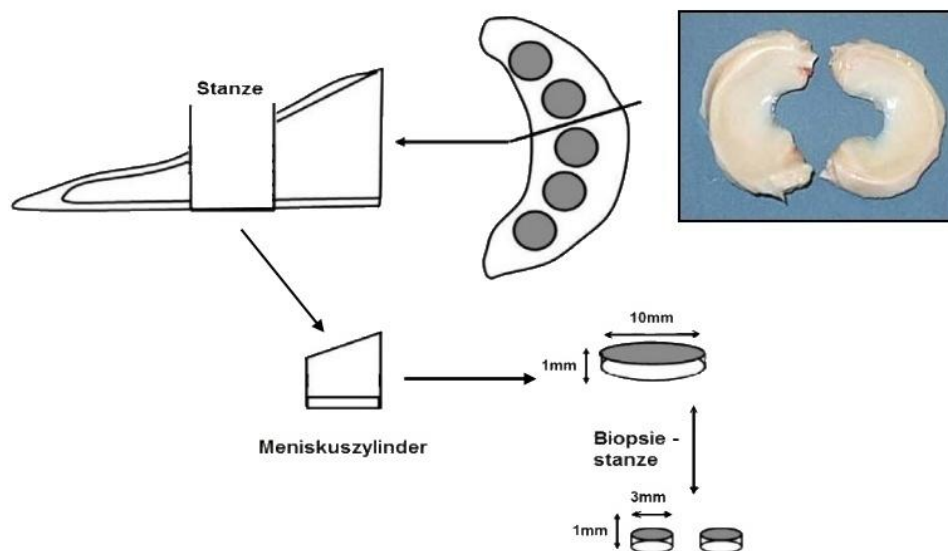


Abb. 3: Fotografische Abbildung der bovinen Menisken und schematische Darstellung der Explantatgewinnung

Nach der Präparation der bovinen Menisken aus dem Kniegelenk erfolgte die Entnahme mehrerer Gewebezylinder mit einer Stanze (Durchmesser 10mm). Im Anschluss wurden mit Hilfe einer Schablone (hier nicht abgebildet) eine Scheibe (Dicke 1 mm) mit einem Skalpell abgetrennt, aus der je 4 bis 5 Explantate (Durchmesser 3 mm, Höhe 1 mm) mit einer Biopsiestanze entnommen wurden. Diese Gewebescheiben (Explantate) wurden für die Untersuchungen verwendet.

Im Anschluss wurde die individuelle Dicke (0,95 - 1,2 mm), sowie das Feuchtgewicht jedes Explantates (8-11 mg) ermittelt. Anschließend wurden die Explantate in Versuchsgruppen aufgeteilt und in Kulturmedium überführt. In der Kultivierung wurden entweder jeweils 1 Explantat in einer 96er-Wellplatte in 250 µl Kulturmedium oder 3 Explantate in einer 24er-Wellplatte mit 1 ml Medium inkubiert. Bei der Einteilung wurde darauf geachtet, die Explantate aus unterschiedlichen Regionen der Menisken, sowie aus dem lateralen und medialen Meniskus gleichmäßig in den Versuchsgruppen zu verteilen.

2.1.4. Aufbau und Funktion der Druckmaschine

Für die vorliegenden Untersuchungen zur Wirkung von verletzender Kompression auf Meniskusgewebe wurde eine Druckmaschine verwendet, die in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Grodzinsky (MIT, Cambridge, USA) entwickelt wurde. Die Maschine ist in einem Inkubator installiert und kann über eine Software von einem angeschlossenen Computer gesteuert werden.

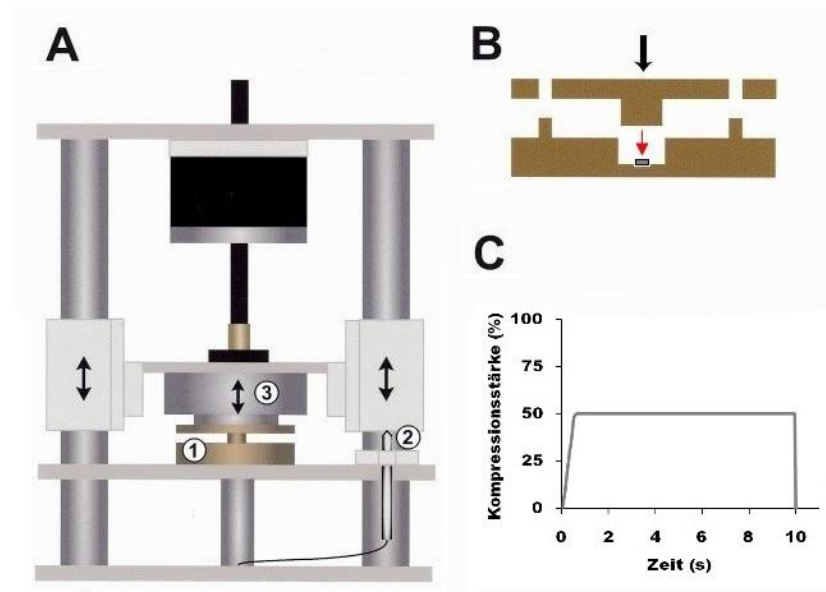


Abb. 4: Schematische Darstellung der verwendeten Druckapparatur, der Polysulfatkammer sowie grafische Darstellung des Kompressionsvorganges

verändert nach (Patwari et al. 2003)

A: Schematische Darstellung der Druckapparatur. Die Apparatur wurde verwendet, um eine verletzende Kompression auf ein einzelnes Meniskusexplantat, platziert innerhalb einer Polysulfatkammer, auszuüben (1). Während des Kompressionsvorganges wurden kontinuierlich Daten über den von dem Druckstempel zurückgelegten Weg (2), und die auftretende Druckbelastung (3) an eine Computersoftware übermittelt. Über den Distanzmesser (2) ließ sich die Maschine auf die Höhe jedes Explantates individuell einstellen.

B: Ein Querschnitt der Polysulfatkammer zeigt das Meniskusexplantat (roter Pfeil), welches im Zentrum der Kammer (Tiefe 10 mm) in einer zentralen Vertiefung (Tiefe 200 µm) platziert wurde. Über den Druckstempel in der Deckplatte der Kammer wurde eine axiale Kompression (schwarzer Pfeil) auf das Explantat übertragen.

C: Während des Kompressionsvorganges wurde über den Druckstempel eine axiale Belastung mit einer Geschwindigkeit von 1 mm/s auf das Explantat ausgeübt. Der Stempel verblieb in der maximalen Kompression (hier 50%) für 10 s und kehrte im Anschluss wieder in seine Ausgangsposition zurück.

Von der Software können der bei der Kompression auftretende Gegendruck des Meniskusgewebes sowie die Kompressionsstärke dezidiert für die einzelnen Phasen (Kompression, statisches Halten) aufgezeichnet werden. Für die Versuche wurde eine Druckkammer aus Polysulfat in der Maschine plaziert. Die Maschine wurde vor jeder Versuchsreihe auf die Maße dieser Kammer geeicht. Eine Vertiefung in der Basisplatte der Druckkammer mit einem Durchmesser von 10 mm bildet die eigentliche Druckkammer. Am Boden befindet sich eine weitere zentrale Vertiefung (200µm tief) in der das Explantat platziert wurde. Somit hatte das Explantat keinen seitlichen Kontakt zur Kammer sondern nur zum Boden und der Oberfläche des Druckstempels (7 mm Durchmesser), der in den Kammerdeckel integriert ist. Dieses ermöglichte dem Meniskusgewebe, sich bei der einwirkenden axialen Kompression seitlich ausdehnen zu können.

2.2. Methoden

2.2.1. Anwenden der verletzenden Kompression

Zur Bearbeitung wurde jeweils ein Explantat unter sterilen Bedingungen aus dem Medium entnommen und in die Druckkammer überführt. In die Kammer wurden zusätzlich 250µl Medium gegeben. Somit war das Explantat auch während des Kompressionsvorgangs von Nährmedium umgeben. Nachdem die Druckmaschine auf die individuelle Dicke des Explantates eingestellt wurde, erfolgte eine einmalige Kompression mit einer Geschwindigkeit von 1 mm/s bis zu einem definierten Prozentsatz der individuellen Explantatdicke (25%, 50%, 60% oder 75%). Nach Erreichen der maximalen Kompression wurde diese für 10 s gehalten. Danach erfolgte die Rückkehr des Druckstempels in seine Ausgangsposition. Während des Kompressionsvorgangs wurde der Gegendruck, den das Meniskusgewebe auf den Stempel ausübt, aufgezeichnet.

2.2.2. Versuchsablauf

Am Tag der Materiallieferung vom Schlachthof wurden die in **2.1.3** beschriebenen Schritte durchgeführt, die Explantate in Versuchsgruppen aufgeteilt und im Anschluss über Nacht in Kulturmedium inkubiert. Am folgenden Tag wurde die verletzende Kompression durchgeführt. Die Explantate wurden direkt im Anschluss an die Kompression in frisch angesetztes Kulturmedium, je nach Versuchsreihe mit Zusatz IL-1, SOD oder NAC, überführt. Es folgte eine Kultivierung für 3 Tage in einem Zellkulturschrank (Firma Hereus) bei 37 °C, 5% CO₂.

2.2.3. Messung der GAG-Konzentration in den Kulturüberständen

Der GAG-Verlust aus dem Meniskusgewebe in den Kulturüberstand wurde mit Hilfe des Dimethylmethylenblau (DMMB) Tests bestimmt. Die Messung der GAG-Konzentration erfolgte nach dreitägiger Inkubation. Dafür wurden in eine Küvette 20 µl Kulturüberstand, 60 µl PBE-Stammlösung und 800 µl DMMB-Lösung gegeben.

Die Glykosaminoglykane im Medium und das DMMB bildeten einen Farbkomplex, dessen Extinktion mit Hilfe eines Photometers (Ultrospec LKB, Biochrom) bei einer Wellenlänge von 525 nm gemessen werden konnte. Die Ergebnisse der GAG-Konzentration in den Kulturüberständen wurden anschließend auf das Feuchtgewicht der Explantate bezogen, dargestellt.

DMMB (Dimethylmethylenblau):

0,04 M DMMB

0,2 M Ethanol

0,04 M NaCl

0,04 M Glycin

0,1 M HCl

PBE-Stammlösung:

0,1 M Na₂HPO₄

0,01 M Na₂EDTA

2.2.4. Messung der NO-Konzentration in den Kulturüberständen

Mit Hilfe des Griess-Reagenz wurde in den Kulturüberständen die NO-Produktion des Meniskusgewebes nach dreitägiger Inkubation gemessen. Bei dieser Methode wird Nitrit (NO₂), ein stabiles Endprodukt von NO mit der Griess-Reaktion in einen Azofarbstoff umgesetzt, der photometrisch bestimmt werden kann. In einer 96er-Mikrotiterplatte wurden pro Well 100 µl Kulturüberstand und 100 µl Griess Reagenz gegeben und für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Konzentrationen von NO₂ in den Kulturüberständen wurde durch Bestimmung der optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 550 nm in einem ELISA-Lesegerät ermittelt. Die Messwerte wurden anhand einer mit Natriumnitrit (NaNO₂) ermittelten Standardkurve in die absoluten NO-Werte (µmol) umgerechnet und bei der Darstellung der Ergebnisse auf das Feuchtgewicht der Explantate bezogen.

2.2.5. Messung der LDH-Aktivität in den Kulturüberständen

Die LDH Aktivität in den Überständen wurde mit Hilfe des Cytotoxicity Detection Kit (Firma Roche) nach dreitägiger Inkubation gemessen. Das Testprinzip beruht darauf, dass die Wasserstoffionen mit Hilfe eines Katalysators (Diaphorase) von NADH/H^+ auf das Tetrazoliumsalz INT übertragen werden, welches im Anschluss zu Formazan reduziert wird. Eine Konzentrationserhöhung der LDH im Überstand korreliert mit der Menge an Formazan. Formazan ist ein Farbstoff, der eine maximale Absorption bei 500 nm zeigt. Für den Test wurden 100 μl des Kulturüberstandes in eine 96-Well Platte überführt und 100 μl Reaktionslösung zugefügt. Im Anschluss erfolgte eine Inkubation für 30 min unter Lichtausschluss und bei Raumtemperatur. Danach wurde die Absorption bei 500 nm in einem ELISA-Lesegerät gemessen.

2.2.6. Durchführung der real time RT-PCR

Für den quantitativen Nachweis der Genexpression matrixdegradierender Proteasen wurde eine real time RT-PCR durchgeführt, welche auf dem Prinzip der Polymerase-Kettenreaktion ("polymerase chain reaction", PCR) beruht. Die PCR stellt eine Methode dar, mit der spezifische Abschnitte der mRNA, mit bekannter Nukleotidsequenz, vermehrt werden können und wurde mit Hilfe des Qiagen QuantiTect® SYBR Green RT-PCR Kit durchgeführt. Die isolierte RNA wird durch eine Reverse Transkription (RT) zunächst in eine komplementäre DNA ("complementary" DNA; cDNA) umgeschrieben. Anschließend erfolgt die Durchführung der PCR, in der die cDNA als Matrize für die Synthese eines neuen komplementären Stranges dient. Die Quantifizierung dieser vervielfältigten DNA wird mit Hilfe von Fluoreszenz-Messungen durchgeführt, die unmittelbar während eines PCR-Zyklus erfasst werden ("real time"). Dabei bindet der Farbstoff SYBR® Green an die vervielfältigte doppelsträngige DNA, was aufgrund der fluoreszierenden Eigenschaften des Farbstoffes nachgewiesen werden kann. Die Zunahme der Fluoreszenz korreliert daher mit der Zunahme der DNA von Zyklus zu Zyklus.

2.2.6.1. Isolierung der RNA aus dem Meniskusgewebe

Für die Isolierung von RNA wurden die Meniskusimplantate mit einem Skalpell zerkleinert und bis zur weiteren Verarbeitung in flüssigem Stickstoff bei $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt. Zur Gewinnung der RNA wurden die Proben in flüssigem Stickstoff mit einem Pistill zerkleinert, in ein Röhrchen überführt und mit 1 ml Trizol versetzt. Mit einem Dispergiergerät wurden die Proben anschließend so lange homogenisiert, bis keine Gewebestückchen mehr zu erkennen waren.

Die Lösung wurde in ein Eppendorfgesäß überführt und 10 min bei 12.000 x g und 4°C zentrifugiert, um die restlichen Zelltrümmer zu entfernen. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand, der Proteine, DNA und RNA enthielt, abgenommen und in ein neues Eppendorfgesäß überführt. Für die Isolierung der RNA wurden 200 µl Chloroform zugefügt. Die Lösung wurde 15 sec geschüttelt und nach einer Inkubationszeit von 2 - 3 min bei Raumtemperatur erneut zentrifugiert (12.000 x g, 15 min, 4 °C).

Es konnten innerhalb der Lösung zwei Phasen beobachtet werden. Die obere Phase, die die RNA enthielt, war farblos und wässrig, während die untere, rötliche, Phenol-Chloroform-Phase Proteine und DNA beinhaltete. Die farblose wässrige Phase wurde vorsichtig abgenommen, ohne dass die Interphase berührt wurde, um eine Verunreinigung der RNA auszuschließen. Die RNA wurde mit 500 µl Isopropylalkohol gefällt und 10 min bei Raumtemperatur kultiviert. Nach einer zehnmütigen Zentrifugation bei 12.000 x g und 4°C war die RNA am Boden des Reaktionsgefäßes sichtbar. Die RNA wurde in 1 ml 75% Ethanol gelöst und 5 min bei 7.500 x g und 4°C zentrifugiert. Dieser Vorgang wurde 2 – 3-mal wiederholt, um mögliche Phenolrückstände zu eliminieren. Im Anschluss daran wurde das Ethanol verworfen und die RNA luftgetrocknet. Dann wurde die RNA in 50 µl RNase-freiem Wasser gelöst und für 10 min bei 55-60°C inkubiert. Nach der photometrischen Bestimmung der RNA-Mengen wurden die Proben bis zur weiteren Verwendung bei - 70 °C eingefroren.

2.2.6.2. Bestimmung der RNA-Menge

Zur Quantifizierung der RNA-Menge wurde die optische Dichte bei einer Wellenlänge von 260 nm (Absorptionsmaximum von RNA) in einem Photometer gemessen. Dafür wurden in eine Quarzküvette 5 µl Probe und 495 µl Aqua bidest. gegeben. Um die Qualität der Probe zu überprüfen und eine mögliche Verunreinigung durch Proteine auszuschließen, wurde die optische Dichte bei einer Wellenlänge von 280 nm (Absorptionsmaximum von Proteinen) gemessen. Das Verhältnis OD_{260}/OD_{280} sollte dabei einen Wert > 1,8 ergeben.

2.2.6.3. Reinigung der RNA

Um DNA-Verunreinigungen zu vermeiden wurde bei der isolierten RNA zunächst ein DNase Verdau durchgeführt. Dafür wurden die zu untersuchenden Proben mit folgendem Reaktionsansatz (Promega) behandelt:

Reaktionsansatz für den DNase-Verdau:

x µl	RNA (x µl = 1-8 µl)
1 µl	RQ1 RNase-freies DNase 10 x Reaktionspuffer
1 µl	RQ1 RNase-freie DNase
	Auffüllen bis 10 µl Endvolumen mit H ₂ O

Zu jeder Probe wurden 1 µl DNase 10 x Reaktionspuffer sowie 1 µl DNase gegeben und 30 min bei 37°C in einem Thermocycler kultiviert. Zur Inaktivierung der DNase wurde 1 µl RQ1 DNase Stop Solution (20 mM EDTA, pH 8,0) zugesetzt und 10 min bei 65°C inkubiert.

2.2.6.4. Vervielfältigung der RNA

Im Anschluss an den DNase-Verdau wurden zur Bestimmung jedes einzelnen Zielgens 50 ng der vorbereiteten RNA eingesetzt. Ein Reaktionsansatz wurde nach folgendem Schema hergestellt:

Reaktionsansatz für RT-PCR:

25 µl	QuantiTect SYBR Green RT-PCR Master Mix
5 µl	Primer (Sense)
5 µl	Primer (Antisense)
0,5 µl	QuantiTect RT Mix
x µl	Template RNA (x µl = 50 ng verdaute RNA)
	Auffüllen bis 50 µl Endvolumen mit H ₂ O

Das "housekeeping" Gen GAPDH (Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase) wurde bei der Messung als Referenzgen verwendet, um sicherzustellen, dass in jedem Reaktionsansatz intakte und gleiche Mengen an RNA vorhanden waren. Für jeden Primer wurde zusätzlich eine "no-template-control" (NTC) angesetzt. Diese Kontrolle enthielt keine Proben RNA, sodass in diesem Ansatz keine Amplifikate gebildet werden und daher kein PCR-Produkt detektierbar sein sollte. Für die Durchführung der real time RT-PCR wurden die in der folgenden Tabelle aufgeführten Primer-Sequenzen für die jeweiligen Zielgene verwendet (**Tab.4**)

Tab. 4: Übersicht die bei der real time RT-PCR verwendeten Primer

Name	Primersequenz (5' → 3')	Schmelztemperatur (T_M in °C)
GAPDH Sense	ATCAAGAAGGTGGTGAAGCAGG	78
GAPDH Antisense	TGAGTGTGCTGCTGTTGAAGTCG	
Aggrekan Sense	TCCACTGACACCAAAGAGT	78
Aggrekan Antisense	TCTGGATTTAGTGGTGAGTATT	
Kollagen Typ II Sense	AAGAAACACATCTGGTTTGGAGAAACC	81
Kollagen Typ II Antisense	ATGGGTGCAATGTCAATGATGGG	
MMP-1 Sense	GGAAGTGTCCGGAATGAGGATCT	78
MMP-1 Antisense	TTGGAATGCTCAAGGCCCA	
MMP-2 Sense	GTACGGGAATGCTGACGGGGAATA	78
MMP-2 Antisense	CCATCGCTGCGGCCTGTGTCTGT	
MMP-3 Sense	CACTCAACCGAACGTGAAGCT	78
MMP-3 Antisense	CGTACAGGAAGTGAATGCCGT	
MMP-9 Sense	TCCCTTCCTTGTCAGAGCAA	*
MMP-9 Antisense	TACTTGGCGCCCAGAGAAGAA	
MMP-13 Sense	TCTTGTTGCTGCCCATGAGT	70
MMP-13 Antisense	GGCTTTTGCCAGTGTAGGTGTA	
ADAMTS-5 Sense	CTCCCATGACGATTCCAA	*
ADAMTS-5 Antisense	AATGCTGGTGAGGATGGAAG	
ADAMTS-4 Sense	CTGTTTACCCGTCAGGACCTGTGT	*
ADAMTS-4 Antisense	TCATGAGCAGCAGTGAAGGCTGA	*

*=keine Schmelztemperatur ermittelbar

Um die DNA um ein Vielfaches amplifizieren zu können, wurden insgesamt 40 Zyklen nach folgendem Schema durchgeführt:

Tab. 5: Übersicht über den real time RT-PCR Zyklus

Schritt	Zeit	Temperatur
Reverse Transkription	30 min	50 °C
initiale Aktivierung	15 min	95 °C
Denaturierung	15 sec	94 °C
Annealing	30 sec	60 °C
Extension	30 sec	72 °C
Unterdrückung von Primerdimeren	15 sec	x °C (s. T_M in Tab.4)
Anzahl der Zyklen: 40		

Zu Beginn der real time RT-PCR wurde für 30 min bei 50°C die mRNA mit Hilfe der Reversen Transkriptase in eine komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben. Im Anschluss daran folgte für 15 min bei 95°C eine initiale Aktivierung der PCR-Reaktion. Anschließend wurden die Proben für 15 sec auf 94°C erhitzt, um die Doppelstränge in zwei komplementäre Einzelstränge zu trennen (Denaturierung). Im folgenden Schritt (Annealing) wurde für die Anlagerung der Primer an die Einzelstränge die Temperatur für 30 sec auf 60°C gesenkt. Als nächstes wurde die Temperatur auf 72°C erhöht, um die Primer zu verlängern (Extension) und die Stränge zu komplementieren. Im Anschluss erfolgte ein weiterer Schritt zur Unterdrückung von Signalen aus Primerdimeren bei einer Temperatur 3°C unter der genspezifischen, optimalen Schmelztemperatur. Innerhalb eines solchen Zyklus wurde die DNA verdoppelt (**Tab. 5**).

2.2.6.5. Auswertung der real time RT-PCR Ergebnisse

Für die relative Quantifizierung wurde die Genexpression des Zielgens auf das "Housekeeping" Gen GAPDH bezogen. Nach einer PCR wurde ein Schwellenwert ("threshold") für die Fluoreszenz festgelegt. Die Anzahl der PCR-Zyklen, bei der dieser Schwellenwert in den einzelnen Reaktionsansätzen erreicht wurde, wird als CT-Wert ("threshold cycle") bezeichnet. Eine Probe mit einem höheren CT-Wert besaß eine niedrigere Konzentration der gesuchten Gene als eine Probe mit einem niedrigeren CT-Wert, da mehr Zyklen benötigt wurden, um den Schwellenwert zu erreichen. Das bedeutet, dass ein um eine Einheit geringerer CT-Wert der doppelten Menge an eingesetzter cDNA entspricht.

Die Expressionsunterschiede wurden nach der $\Delta\Delta\text{CT}$ -Methode berechnet. In einem ersten Schritt wurde für jede Probe und Kontrolle die Differenz zwischen den gemessenen CT-Werten des Zielgens und des Referenzgens gebildet. Von diesem ΔCT -Wert der stimulierten Proben wurde der ΔCT -Wert der unbehandelten Kontrolle abgezogen.

$$\Delta\text{CT (Probe)} = \text{CT (Probe; Zielgen)} - \text{CT (Probe; Referenzgen)}$$

$$\Delta\text{CT (Kontrolle)} = \text{CT (Kontrolle; Zielgen)} - \text{CT (Kontrolle; Referenzgen)}$$

$$\Delta\Delta\text{CT} = \Delta\text{CT (Probe)} - \Delta\text{CT (Kontrolle)}$$

CT: "threshold cycle"; Anzahl der PCR-Zyklen

Probe: stimulierte Probe

Kontrolle: Kontrollgruppe

Zielgene: MMP-1, -2, -3, -9, -13, ADAMTS-4, -5, Kollagen Typ II, Aggrekan

Referenzgen: GAPDH

Mit jedem Zyklus verdoppelt sich die DNA. Daher wurde bei der Berechnung der Expressionsunterschiede zwischen einer stimulierten Probe und der unbehandelten Kontrolle relativ zum Referenzgen folgende Formel verwendet:

$$\text{relative Zielgenmenge} = 2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$$

2.2.7. Fixieren der Gewebeproben für histologische Untersuchungen

Die bovinen Meniskusexplantate wurden nach Beendigung der Versuchsdurchführung in Paraformaldehyd (4% in PBS) fixiert. Im Anschluss wurde das Gewebe in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert, mit Methylbenzoat behandelt und dann in Paraplast überführt. Die Einbettung erfolgte in einem Vakuumschrank. Nach dem Aushärten des Paraffins konnten mit Hilfe eines Mikrotoms Schnitte (Dicke 7 μm) zur histologischen Darstellung und weiteren Färbung angefertigt werden.

2.2.7.1. Färbung der histologischen Schnitte mit Toluidinblau

Toluidinblau-Färbelösung:

0,0714% (w/v)	Toluidinblau
0,0714% (w/v)	Pyronin G
0,143% (w/v)	Dinatriumtetraborat ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$)

Zur lichtmikroskopischen Darstellung des Meniskusgewebes wurden die zuvor mit Paraformaldehyd fixierten Paraffinschnitte mit Toluidinblau gefärbt. Die Gewebeschnitte wurden zunächst mit Xylol (3 x 5 min) aus dem Paraffin gelöst, je 5 min in einer absteigenden Alkoholreihe (100%, 96%, 90%, 80%, 70%, 50%) behandelt und anschließend mit Aqua dest. gespült. Nach 5 min Inkubation in der Toluidinblau-Färbelösung wurden die Schnitte erneut mit Aqua dest. gespült und in 96% Ethanol getaucht. Nach einer Behandlung mit Propanol (3 x 3 min) und Entwässerung mit Xylol (3 x 5 min) wurden die Schnitte mit DePeX® versiegelt.

2.2.7.2. Färbung der histologischen Schnitte nach der TUNEL-Methode

Um in dem Meniskusgewebe die Anzahl abgestorbener Zellen zu quantifizieren, wurden histologische Schnitte nach der TUNEL-Methode (TUNEL = TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling) gefärbt. In untergegangenen Zellen wird vermehrt fragmentierte DNA mit charakteristischen, freien 3'-OH Enden gefunden. Diese vermehrten Strangbrüche können durch die TUNEL-Färbung in einer enzymatischen Reaktion mit modifizierten Nukleotiden und einem Antikörper markiert und sichtbar gemacht werden. Die Färbung der Schnitte wurde mit dem ApopTag® Peroxidase In Situ Apoptosis Detection Kit (Firma Chemicon, USA) durchgeführt. Die mit Paraformaldehyd fixierten Präparate wurden zunächst mit Xylol (3 x 5 min) aus dem Paraffin gelöst, in einer absteigenden Alkoholreihe (100 % 5min, 96 % 3 min, 70 % 3 min) geschwenkt und anschließend 5 min in PBS gespült. Im Anschluss erfolgte ein Proteinverdau durch Behandlung mit Proteinase K (20 µg/ml) für 15 min und daraufhin Spülung mit Aqua dest. (2x 5 min).

Es folgte eine Inkubation in 3% Wasserstoffperoxid für 5 min und eine erneute Spülung mit Aqua dest. (2x 5min). Im Anschluss wurde der Equilibration Puffer (ApopTag®-Kit) auf das Präparat aufgetragen (75µl). Es folgte die Applikation des TdT-Enzyms (16,5µl gelöst in 38,5µl Reaktions Puffer, 11µl je cm²) und anschließend Spülung im Stop/Wash-Puffer (ApopTag®-Kit) für 10 min. Daraufhin wurde der Anti-digoxigenin Antikörper auf das Präparat aufgetragen, 30min inkubiert und dann mit PBS gespült (4x 2min). Im Anschluss wurde

Diaminobenzidin (0,05%, 15 µl pro 1cm²) appliziert und nach 6 min Inkubation mit Aqua dest. gespült (3x 1 min). Es folgte die abschließende Färbung mit Methyl-Grün (0,5%) für 10min und eine erneute Spülung mit Aqua dest. (10x eintauchen für 30 sec) und 100% N-Butanol (10x eintauchen für 30 sec.). Zur endgültigen Fixation wurden die Präparate in Xylol entwässert (3x 2min) und mit DePeX[®] versiegelt.

2.3. Statistische Auswertung

Die in der vorliegenden Arbeit dargestellten Ergebnisse wurden als Mittelwert und Standardabweichung vom Mittelwert angegeben. Für die statistische Analyse wurde der "student's t-test" verwendet. Der Test wurde 2-seitig bei ungleicher Varianz durchgeführt. Es wurde die Zuverlässigkeit einer Aussage als signifikant angenommen, wenn eine Irrtumswahrscheinlichkeit (p) von $\leq 0,05$ ermittelt wurde.

3. Ergebnisse

3.1. Lichtmikroskopische Darstellung des Meniskugewebes

Für die lichtmikroskopische Darstellung wurden histologische Schnitte aus einem unbehandelten Explantat angefertigt und mit Toluidinblau angefärbt (s. 2.2.7.1). Bei der Betrachtung im Mikroskop ließen sich die in 1.1.2 beschriebenen unterschiedlichen Gewebeschichten im Meniskus unterscheiden.

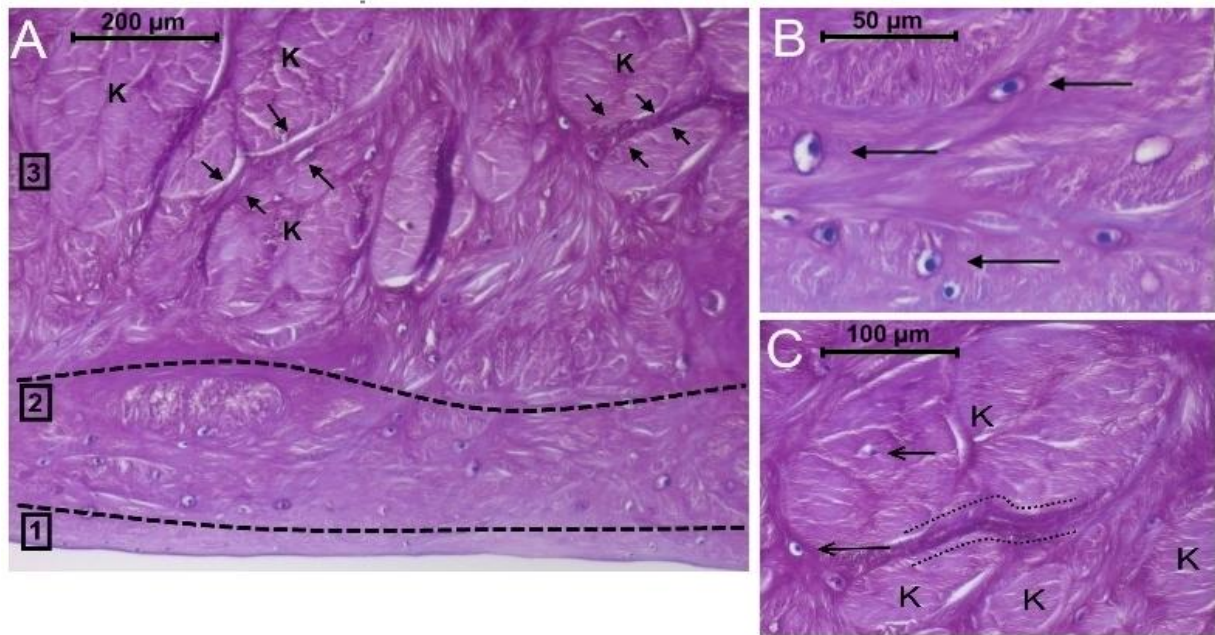


Abb. 5: Lichtmikroskopische Darstellung des Meniskugewebes (Toluidinblau Färbung)

A: In diesem Ausschnitt eines Meniskusexplantates lassen sich die in 1.1.2, Abb.2 schematisch dargestellten Schichten erkennen. In der ersten Schicht **(1)**, die in vivo dem Tibiaplateau auflag, sind die Fasern parallel angeordnet und bilden eine glatte Oberfläche. Die zweite Schicht **(2)** besteht aus faserknorpelartigem Gewebe. Die Zellen zeigen den für Knorpelzellen charakteristischen "Hof". Die dritte und dickste Schicht **(3)** die 2/3 des gesamten Explantates ausmacht, wird überwiegend von den massiven Kollagenfaserbündeln **(K)** gebildet, die von Faserknorpelsträngen (**→**) durchzogen werden.

B: An diesem Ausschnitt aus dem histologisch faserknorpeligen Anteil in der zweiten Schicht lassen sich die Zellen mit runden Zellkernen und dem charakteristischen „Hof“ (**→**) deutlich erkennen.

C: Diese Vergrößerung aus der tiefen Schicht des Meniskugewebes zeigt mehrere massive Kollagenfaserbündel **(K)**, die durch Faserknorpelsepten getrennt sind (gestrichelte Linie). Die Zahl der Zellen (**→**) ist in dieser Schicht geringer als in den oberflächlichen Schichte und der "Hof" ist geringer ausgeprägt. Die Septen entsprechen morphologisch der zweiten Schicht und damit einem Faserknorpelgewebe.

Die Oberfläche besteht aus einem Netz feiner Kollagenfibrillen, während die darunter liegende Gewebeschicht von lamellenartigen kreuzenden Faserbündeln gebildet wird. In der tiefsten Schicht finden sich überwiegend zirkulär angeordnete Bündel aus Kollagen, die von Faserknorpelsepten durchzogen und durch einzelne, radiär verlaufende Bündel verstärkt werden.

3.2. Untersuchungen zum Gegendruck des Meniskugewebes unter Kompression

Bei diesen Untersuchungen wurde der Gegendruck, den das Meniskugewebe unter zunehmender Kompression auf den Stempel der Versuchsanordnung ausübte aufgezeichnet. Die Messung erfolgte kontinuierlich während des gesamten Kompressionsvorgangs.

3.2.1. Verlauf des Gegendrucks während der Kompression

In diesem Versuch wurden die Druckwerte während des gesamten Kompressionsvorgangs exemplarisch von jeweils einem Explantat aufgezeichnet. Die Kompression erfolgte nach dem in 2.3.1 erläuterten Schema mit einer Geschwindigkeit von 1 mm/s bis zu dem jeweils definierten Maximum von 25%, 50% und 75% der individuellen Explantatdicke. Es folgte das statische Halten der Maximalkompression für 10 s und anschließend die Rückkehr des Druckstempels in die Ausgangsposition, wobei keine Druckaufzeichnung mehr stattfand.

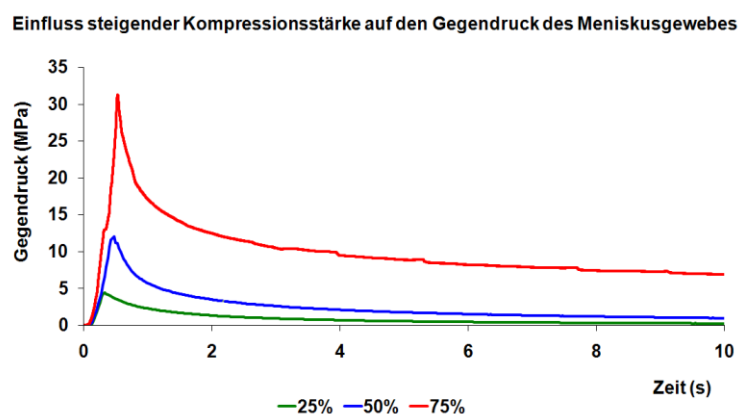


Abb. 6: Grafische Darstellung, des vom Meniskugewebe ausgeübten Gegendrucks für drei exemplarische Kompressionsvorgänge

Jeweils ein Meniskusexplantat wurde um 25%, 50% oder 75% der Explantatdicke mit einer Geschwindigkeit von 1 mm/s einmalig komprimiert. Es folgte das statische Halten in der maximalen Kompression für 10 s und anschließend die Rückkehr des Druckstempels in die Ausgangsposition. Während des Kompressionsvorgangs wurde der Verlauf des Gegendrucks, der durch das Meniskugewebe auf den Stempel ausgeübt wurde in MPa aufgezeichnet und hier gegen die Zeit grafisch dargestellt.

Es zeigte sich bei allen drei Kompressionsstufen ein rasches Ansteigen des Gegendrucks auf die jeweiligen Maxima innerhalb der ersten 500 ms. Dabei zeigten sich Druckspitzen von 4,3 MPa für 25%, 11,9 MPa für 50% und 31,2 MPa für eine Kompression um 75% der Explantatdicke. Während der anschließenden statischen Kompression sank der Gegendruck der durch das komprimierte Gewebe ausgeübt wurde.

Der stärkste Druckabfall wurde innerhalb der ersten Sekunde registriert. Bei einer Kompression um 25% nahm der Gegendruck innerhalb der ersten Sekunde um 50% ab. Bei 50% Kompression sank der Druck um 47% und für 75% Kompression wurde eine Abnahme von 54% in der ersten Sekunde gemessen. Im Anschluss sank der Gegendruck langsamer weiter auf die Minima von 0,24 MPa bei 25%, 0,9 MPa bei 50% und 6,8 MPa bei 75% Kompression, bevor der Stempel in die Ausgangsposition zurückgekehrt ist (**Abb. 6**).

3.2.2. Gegendruck des Meniskugewebes bei steigender Kompressionsstärke

Das Meniskugewebe baut bei zunehmender Kompression einen immer stärkeren Gegendruck auf. In dieser Analyse wurde der Mittelwert für den maximalen Gegendruck aus allen durchgeführten und aufgezeichneten Kompressionsvorgängen ermittelt.

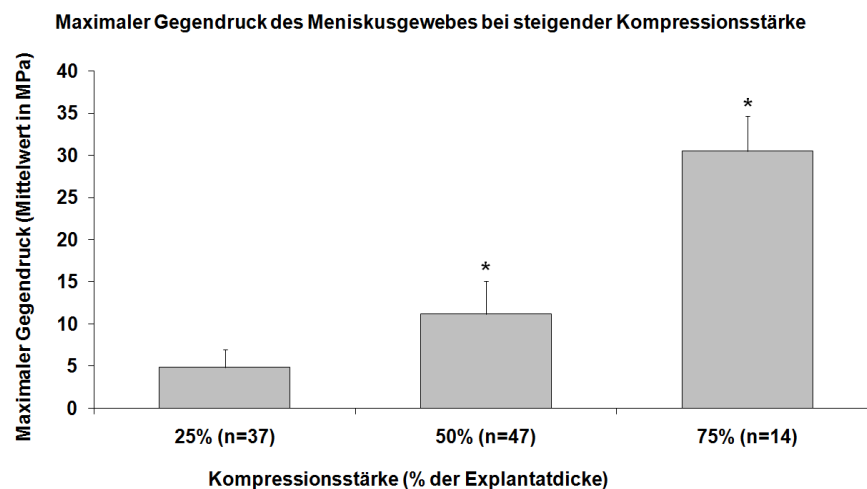


Abb. 7: Grafische Darstellung des maximalen, durch das Meniskugewebe ausgeübten Gegendrucks bei verschiedenen Kompressionsstärken

Die Meniskusexplantate wurden je nach Versuchsreihe um 25%, 50% oder 75% der Explantatdicke mit einer Geschwindigkeit von 1 mm/s einmalig komprimiert. Während des Kompressionsvorgangs wurde der Gegendruck, der durch das Meniskugewebe auf den Stempel ausgeübt wurde aufgezeichnet. Darstellung von Mittelwert und Standardabweichung der maximalen Gegendrucke für 25% (n=37), 50% (n=47) und 75% (n=14) Kompressionsstärke. * = $p < 0,05$

Bei einer Kompression um 25% (n=37) der Explantatdicke wurde ein Spitzendruck von 4,9 MPa gemessen. Bei einer Kompressionsstärke von 50% (n=37) betrug der Gegendruck 11,2 MPa und eine Kompression um 75% (n=14) resultierte im Mittel in einem maximalen Gegendruck von 30,5 MPa (**Abb. 7**).

3.3. Untersuchungen zum GAG-Verlust

Die Freisetzung an Proteoglykanen in das Kulturmedium wurde mit Hilfe des DMMB-Tests (s. **2.2.3**) nach dreitägiger Inkubation bestimmt und auf das Feuchtgewicht der Explantate bezogen. Aus den Ergebnissen der Einzelmessungen (μg GAG je mg Feuchtgewicht) wurde der Mittelwert gebildet und in Prozent der Kontrollgruppe (=100%) dargestellt.

3.3.1. Einfluss von ansteigender Kompressionsstärke auf den GAG-Verlust

Die Meniskusexplantate wurden einen Tag nach der Herstellung einer einmaligen verletzenden Kompression unterzogen und im Anschluss 3 Tage kultiviert. Die Kompression erfolgte in den verschiedenen Versuchsgruppen bis jeweils 25%, 50% und 75% der individuellen Explantatdicke mit einer Geschwindigkeit von 1 mm/s.

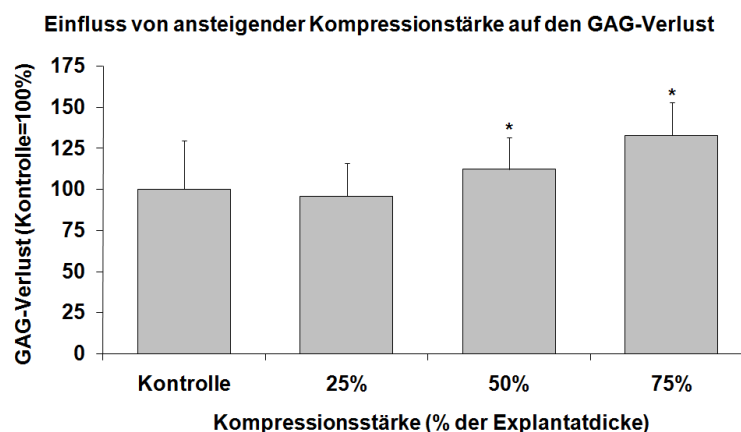


Abb. 8: Einfluss von ansteigender Kompressionsstärke auf den GAG-Verlust

Die Meniskusexplantate wurden einer einmaligen Kompression um 25%, 50% oder 75% der Explantatdicke mit einer Geschwindigkeit von 1 mm/s unterzogen und im Anschluss 3 Tage kultiviert. Der GAG-Gehalt im Kulturmedium wurde mit Hilfe des DMMB-Tests ermittelt (s. **2.2.3**). n=15 je Versuchsgruppe aus 3 unabhängigen Experimenten. Darstellung der Mittelwerte in Prozent der Kontrolle (=100%) + Standardabweichung. * = $p < 0,05$ in Relation zur Kontrolle.

In der Kontrollgruppe zeigte sich ein basaler Verlust von 7,9 μg Proteoglykanen je mg Feuchtgewicht. Eine Kompression um 25% beeinflusste den GAG-Verlust nicht signifikant während eine 50% Kompression zu einer signifikanten Steigerung um 12% gegenüber der Kontrollgruppe führte. 75% Kompression resultierte in einer Zunahme der GAG-Verlust um 32% (**Abb. 8**).

3.3.2. Einfluss von IL-1 und Kompression auf den GAG-Verlust

Für die Untersuchungen wurde IL-1 α als Modells substanz verwendet. Bei der Untersuchung zur Wirkung auf Meniskusgewebe in Kombination mit einer einmaligen verletzenden Kompression wurden 10ng IL-1 pro ml Kulturmedium zugesetzt. Die Kompression erfolgte mit einer Stärke von 50% bei einer Geschwindigkeit von 1 mm/s.

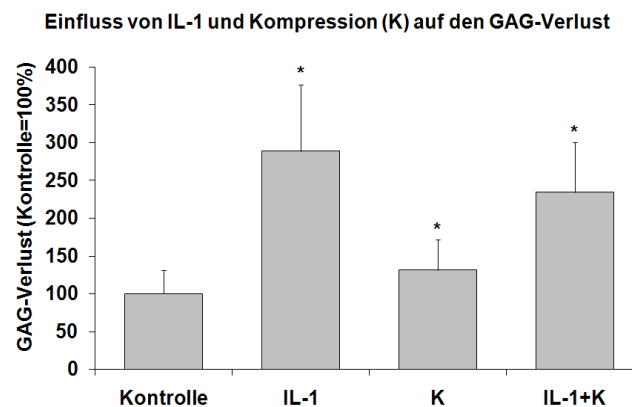


Abb. 9: Einfluss von IL-1 und Kompression auf den GAG-Verlust

Der GAG-Gehalt im Kulturmedium wurde mit Hilfe des DMMB-Tests nach dreitägiger Kultivierung ermittelt (s. 2.2.3). **K** = einmalige 50% Kompression der Meniskusexplantate mit einer Geschwindigkeit von 1 mm/s. **IL-1** = Zusatz von 10 ng IL-1 je ml Kulturmedium. n=19 je Versuchsgruppe aus 4 unabhängigen Experimenten. Darstellung der Mittelwerte in Prozent der Kontrolle (=100%) + Standardabweichung. * = p< 0,05 in Relation zur Kontrolle.

In dieser Versuchsreihe wurde in der Kontrollgruppe ein basaler Verlust von 3,1 μg Proteoglykanen je mg Feuchtgewicht gemessen. Nach der Inkubation in Kulturmedium mit Zusatz von 10 ng IL-1 hat sich eine hoch signifikante Steigerung der GAG-Verlust um 188% gegenüber der Kontrollgruppe gezeigt. Bei der alleinigen Kompression (K) der Explantate um 50% nahm die GAG-Konzentration im Medium um 31% zu, während die Kombination aus Kompression und IL-1 (IL-1+K) eine um 134% gesteigerte Freisetzung in Relation zur Kontrollgruppe zeigte. Im Vergleich mit der IL-1 Gruppe ohne Kompression war die Konzentration um 54% vermindert (**Abb. 9**).

3.3.3. Einfluss von Antioxidantien und Kompression auf den GAG-Verlust

In dieser Versuchsreihe wurde der Einfluss von SOD und NAC auf den GAG-Verlust aus Meniskusexplantaten untersucht, die zuvor einer verletzenden Kompression ausgesetzt waren. Im Kulturmedium wurde SOD in einer 2,5µM, und NAC in einer 1mM Konzentration zugesetzt. Die Kompression erfolgte mit einer Geschwindigkeit von 1 mm/s bis zum Maximum von 60% der Explantatdicke.

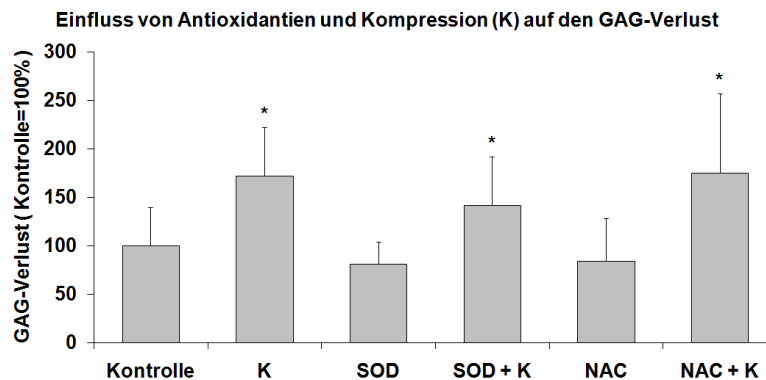


Abb. 10: Einfluss von Antioxidantien und Kompression auf den GAG-Verlust

Der GAG-Gehalt im Kulturmedium wurde mit Hilfe des DMMB-Tests nach dreitägiger Kultivierung ermittelt (s. 2.2.3). **K** = einmalige 60% Kompression der Meniskusexplantate mit einer Geschwindigkeit von 1 mm/s. **SOD** = Zusatz von MnTMPyP (2,5µM) im Kulturmedium. **NAC** = Zusatz von N-Acetyl-Cystein (1mM) im Kulturmedium. n=18 je Versuchsgruppe aus drei unabhängigen Experimenten. Darstellung der Mittelwerte in Prozent der Kontrolle + Standardabweichung. * = $p < 0,05$ der komprimierten Gruppen in Relation zur jeweiligen Kontrolle.

Die alleinige Kompression um 60% resultierte in dieser Versuchsreihe mit einem um 70% erhöhten GAG-Verlust im Vergleich zu der Kontrollgruppe. Die Zugabe der Antioxidantien ohne Kompression ergab mit 19% für SOD und 16% für NAC nur eine geringe Abnahme des GAG-Verlusts in Relation zu der unbehandelten Kontrollgruppe. Die Kombination aus Kompression und SOD ergab eine, gegenüber der alleinigen Kompression um 30% verminderte GAG-Konzentration während die Addition von NAC zur Kompression eine um 4% sogar leicht erhöhte Freisetzung ergab (**Abb. 10**). Jedoch war keiner der Antioxidantien-induzierten Effekte signifikant.

3.4. Untersuchungen zur NO-Freisetzung

Im Anschluss an eine dreitägige Inkubation wurde mit Hilfe des Griess-Reagenz (s. 2.2.4) in den Kulturüberständen die Produktion von NO_2 , einem stabilen Endprodukt von NO gemessen und auf das Feuchtgewicht der Explantate bezogen ($\mu\text{mol NO/mg}$).

3.4.1. Einfluss ansteigender Kompressionsstärke auf die NO-Freisetzung

Die Explantate wurden einen Tag nach der Herstellung einmalig um 25%, 50% oder 75% der jeweiligen Explantatdicke komprimiert und anschließend 3 Tage kultiviert.

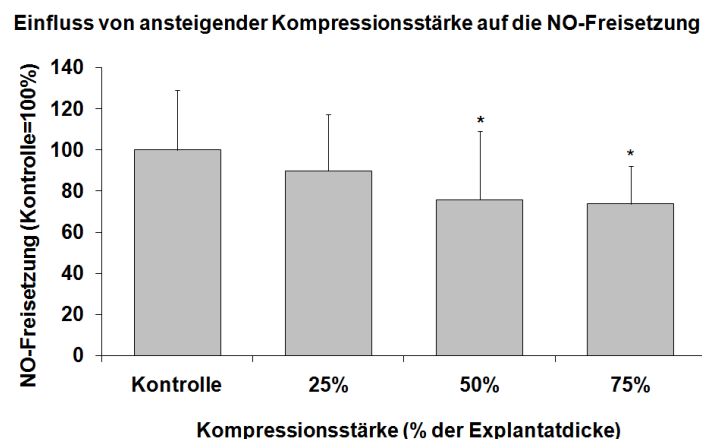


Abb. 11: Einfluss von ansteigender Kompressionsstärke auf die NO-Freisetzung

Die Meniskusexplantate wurden einer einmaligen Kompression um 25%, 50% oder 75% der Explantatdicke mit einer Geschwindigkeit von 1 mm/s unterzogen und im Anschluss 3 Tage kultiviert. Messung der NO-Konzentration im Kulturmedium mit Hilfe des Griess-Reagenz (s. 2.2.4). $n=15$ je Versuchsgruppe aus drei unabhängigen Experimenten. Darstellung der Mittelwerte in Prozent der Kontrolle + Standardabweichung. * = $p < 0,05$ der komprimierten Gruppen in Relation zu der Kontrollgruppe.

Für die Kontrollgruppe wurde dabei eine basale NO-Freisetzung von $0,032 \mu\text{mol NO/mg}$ Feuchtgewicht ermittelt. Im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe bewirkte eine Kompression um 25% der Explantatdicke eine Abnahme der NO-Konzentration um 10%. Die Steigerung der Kompression auf 50% zeigte eine Reduktion der NO-Konzentration im Vergleich zur Kontrolle um 24%. Eine weitere Verstärkung der Konzentration auf 75% bewirkte keine weitere Abnahme der NO-Konzentration im Vergleich zur Versuchsgruppe mit 50% Kompression (**Abb. 11**).

3.4.2. Einfluss von IL-1 und Kompression auf die NO-Freisetzung

In der folgenden Versuchsreihe sollten die Auswirkungen von IL-1 (10 ng/ml) im Kulturmedium auf die NO-Freisetzung aus dem Meniskusgewebe sowie der Effekt einer zusätzlichen 50% Kompression untersucht werden. Die Explantate wurden einen Tag nach der Herstellung einer einmaligen Kompression von 50% der Explantatdicke mit einer Geschwindigkeit von 1 mm/s unterzogen und im Anschluss daran 3 Tage je nach Versuchsgruppe mit oder ohne Zusatz von IL-1 kultiviert.

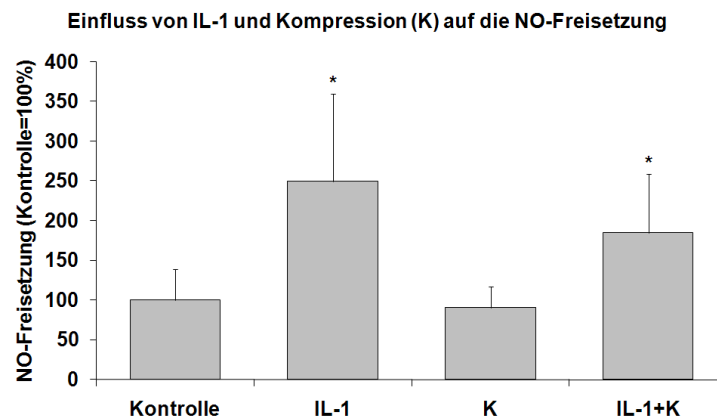


Abb. 12: Einfluss von IL-1 und Kompression auf die NO-Freisetzung

Die Messung der NO-Konzentration im Kulturmedium nach dreitägiger Inkubation erfolgte mit Hilfe des Griess-Reagenz (s. 2.2.4). **K** = Kompression der Meniskusimplantate um 50% mit 1 mm/s. **IL-1** = Zusatz von 10ng IL-1 pro ml Kulturmedium. n=15 je Versuchsgruppe aus drei unabhängigen Experimenten. Darstellung der Mittelwerte in Prozent der Kontrolle + Standardabweichung. * = $p < 0,05$ in Relation zu der Kontrollgruppe.

In dieser Versuchsreihe wurde in der Kontrollgruppe eine basale NO-Freisetzung von $0,052 \mu\text{mol je mg Feuchtgewicht}$ ermittelt. Nach Inkubation in Kulturmedium mit Zusatz von IL-1 zeigte sich in der Versuchsgruppe ohne Kompression gegenüber der Kontrolle eine um 149% stark gestiegene NO-Konzentration im Medium. Die Kompression der Meniskusimplantate um 50% ergab eine zur Kontrolle um 10% nicht signifikant reduzierte NO-Konzentration. Eine Kombination aus Kompression und IL-1 resultierte in einer um 84% höheren Konzentration in Relation zur Kontrolle. Es wurde jedoch 65% weniger NO freigesetzt als in der Versuchsgruppe bei der nur IL-1 zugesetzt wurde (**Abb. 12**).

3.4.3. Einfluss von Antioxidantien und Kompression auf die NO-Freisetzung

In dieser Versuchsreihe wurde der Einfluss von SOD und NAC auf die NO-Freisetzung aus dem Meniskusgewebe nach einer verletzenden Kompression untersucht. Dafür wurde in den jeweiligen Versuchsgruppen eine Konzentration von 2,5µM für SOD und 1mM für NAC im Kulturmedium verwendet. Die Explantate wurden einen Tag nach der Herstellung einmalig um 60% der jeweiligen Explantatdicke mit einer Geschwindigkeit von 1mm/s komprimiert und im Anschluss 3 Tage kultiviert.

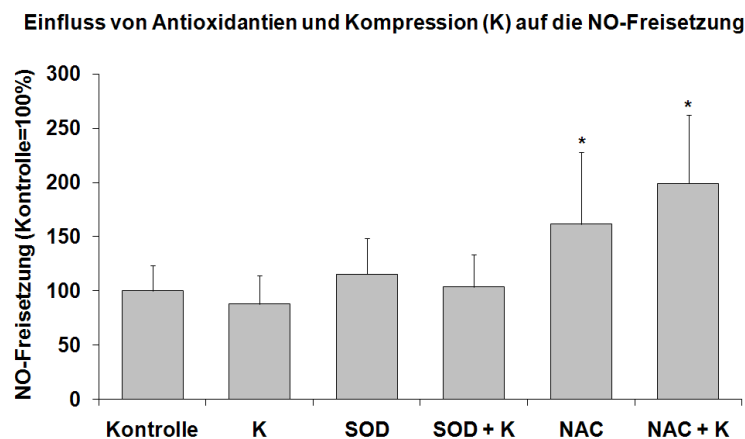


Abb. 13: Einfluss von Antioxidantien und Kompression auf die NO-Freisetzung

Die Messung der NO-Konzentration im Kulturmedium nach dreitägiger Inkubation erfolgte mit Hilfe des Griess-Reagenz (s. 2.2.4). **K** = Kompression der Meniskusexplantate um 60% mit 1 mm/s. **SOD** = Zusatz von MnTMPyP (2,5µM) im Kulturmedium. **NAC** = Zusatz von N-Acetyl-Cystein (1mM) im Kulturmedium. n=15 je Versuchsgruppe aus drei unabhängigen Experimenten. Darstellung der Mittelwerte in Prozent der Kontrolle + Standardabweichung.

* = $p < 0,05$ in Relation zu der jeweiligen Kontrollgruppe.

Für die Kontrollgruppe wurde eine basale NO-Freisetzung von 0,019 µmol NO je mg Feuchtgewicht gemessen. In der Kompressionsgruppe zeigte sich eine um 12% verringerte Freisetzung im Vergleich zur Kontrolle. Die Inkubation in Kulturmedium mit Zusatz von SOD (2,5µM) ergab eine nicht signifikante Steigerung der NO-Konzentration um 15%. Eine Kombination aus SOD zeigte im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe keine Veränderung der NO-Konzentration. Die Zugabe von NAC (1mM) hingegen resultierte in einer NO-Konzentration, die im Vergleich zur Kontrollgruppe um 61% signifikant erhöht war. Eine zusätzliche Kompression ergab eine um 91% deutlich höhere NO-Konzentration als in der unbehandelten Kontrollgruppe.

3.5. Untersuchungen zur mRNA-Expression von matrixdegradierenden Enzymen

Die Expression der MMPs und Aggrekanasen wurde nach der Inkubationszeit von 3 Tagen mit Hilfe der real time RT-PCR bestimmt (s. 2.2.6). Bei der Darstellung der Ergebnisse wurde die unbehandelte Kontrolle gleich 1 gesetzt und die Werte der einzelnen Zielgene für die jeweiligen Experimente in Relation dazu logarithmisch dargestellt.

3.5.1. Einfluss steigender Kompressionsstärken auf die mRNA-Expression

Bei dieser Versuchsreihe wurden die Meniskusexplantate einmalig um 25%, 50% oder 75% der jeweiligen Explantatdicke komprimiert und anschließend 3 Tage kultiviert.

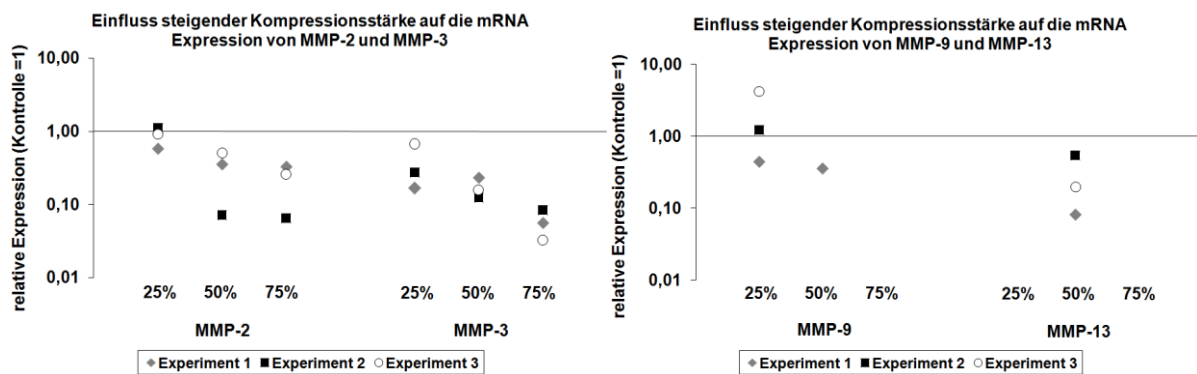


Abb. 14: Einfluss steigender Kompressionsstärke auf die mRNA-Expression von MMP-2, -3, -9 und 13

Die Meniskusexplantate wurden einmalig um 25%, 50% oder 75% der Explantatdicke mit einer Geschwindigkeit von 1 mm/s komprimiert und 3 Tage kultiviert. Im Anschluss wurde die mRNA-Expression von MMP-2, -3, -9, und -13 mittels einer real time RT-PCR ermittelt (s. 2.2.6). Die Expression ist relativ zur unbehandelten Kontrolle (=1) logarithmisch dargestellt. n=3 je Versuchsgruppe aus 3 unabhängigen Experimenten.

MMP-2: Für MMP-2 zeigte sich bei 25% Kompression keine Veränderung im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe während bei 50% die Expression von MMP-2 in allen Experimenten vermindert war. Die Steigerung der Kompression auf 75% führte zu keinem weiteren Absinken der mRNA-Expression im Vergleich zur Versuchsgruppe mit 50% Kompression (**Abb. 14**).

MMP-3: MMP-3 zeigte schon bei einer Kompression um 25% eine marginal verringerte Expression. In der Versuchsgruppe mit 50% Kompression nahm die Expression dann deutlich um das 7-fache ab und bei der maximalen Kompression von 75% der Explantatdicke war die Expression um den Faktor 20 im Vergleich zur Kontrolle reduziert (**Abb. 14**).

MMP-9: MMP-9 wurde nur bei 25% und einmalig bei 50% Kompression mit abweichenden Werten detektiert (**Abb. 14**).

MMP-13: Für MMP-13 war eine Expression nur bei 50% Kompression messbar. Hier zeigte sich tendenziell eine Abnahme der Expression, allerdings mit unterschiedlicher Stärke in den Einzelexperimenten (**Abb. 14**).

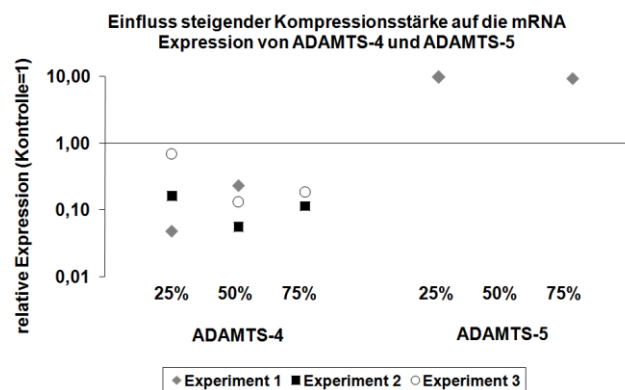


Abb. 15: Einfluss steigender Kompressionsstärke auf die mRNA Expression von ADAMTS-4 und ADAMTS-5

Die Meniskusexplantate wurden einmalig um 25%, 50% oder 75% der Explantatdicke mit einer Geschwindigkeit von 1 mm/s komprimiert und 3 Tage kultiviert. Im Anschluss wurde die mRNA-Expression von ADAMTS-4 und -5 mittels einer real time RT-PCR ermittelt (s. 2.2.6). Die Expression ist relativ zur unbehandelten Kontrolle (=1) logarithmisch dargestellt. n=3 je Versuchsgruppe aus 3 unabhängigen Experimenten.

ADAMTS-4: Die Aggrekanase ADAMTS-4 zeigte eine zur Kontrolle verminderte Expression in allen drei Kompressionsgruppen, wobei die Abnahme in den Einzelexperimenten nicht einheitlich war, so dass sich keine eindeutige Abhängigkeit von der Kompressionsstärke feststellen lässt (**Abb. 15**).

ADAMTS-5: Eine Expression von ADAMTS-5 wurde nur in einem Experiment bei 25% und 75%, mit einer im Vergleich zur Kontrolle stark erhöhten Kompression gemessen. Hier ist anzumerken, dass auch in der Kontrollgruppe eine Expression von ADAMTS-5 nur sporadisch messbar war (**Abb. 15**).

3.5.2. Einfluss von IL-1 und Kompression auf die mRNA-Expression

Diese Versuchsreihe untersucht den Einfluss von IL-1 und verletzender Kompression auf die Expression von Matrix degradierenden Enzymen und ihren Substraten. Die Meniskusexplantate wurden einmalig um 50% ihrer Dicke komprimiert und anschließend 3 Tage in Kulturmedium, je nach Versuchsgruppe mit Zusatz von IL-1 (10 ng/ml), kultiviert.

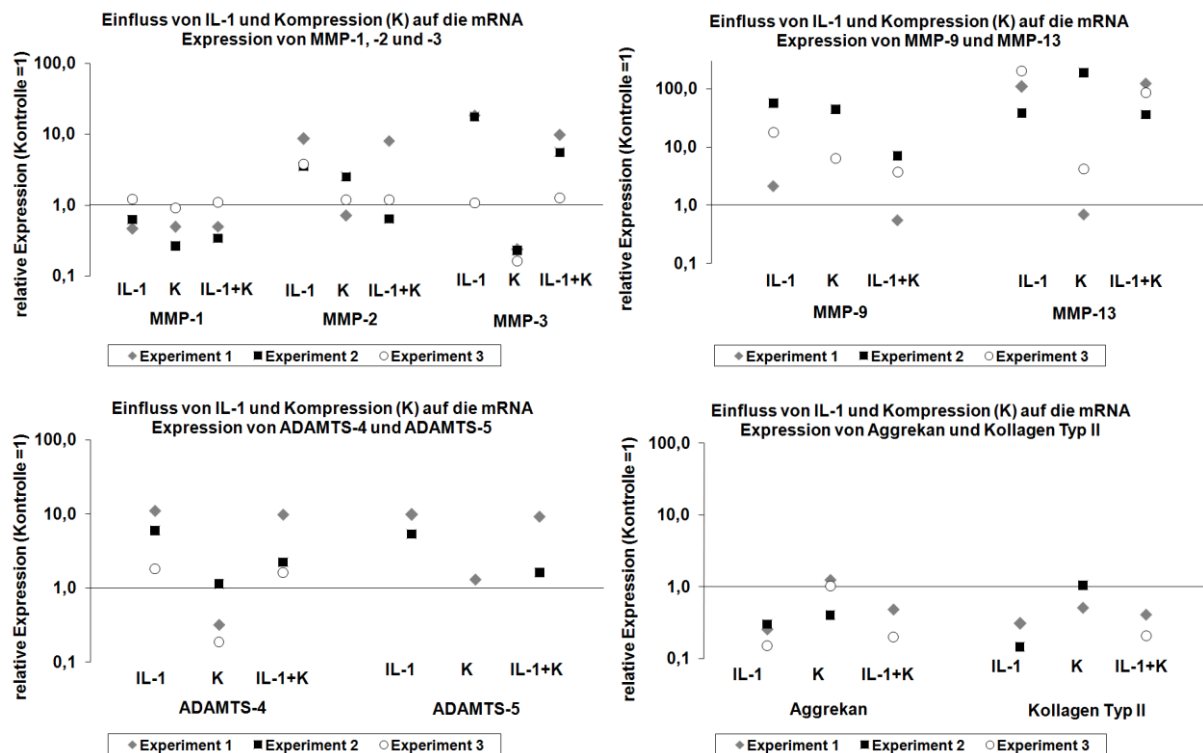


Abb. 16: Einfluss von IL-1 und Kompression auf die mRNA-Expression von MMP-1, -2, -3, -9, -13, ADAMTS-4 und -5 sowie Aggrecan und Kollagen Typ II

Im Anschluss an eine dreitägige Inkubation wurde die mRNA-Expression von MMP-1, -2, -3, -9, -13, ADAMTS-4 und -5 sowie Aggrecan und Kollagen Typ II mit einer real time RT-PCR ermittelt (s. 2.2.6). **K** = 50% Kompression der Explantate mit einer Geschwindigkeit von 1 mm/s. **IL-1** = Zusatz von 10 ng IL-1 pro ml Kulturmedium. Die mRNA Expression ist relativ zur unbehandelten Kontrolle (=1) logarithmisch dargestellt. n=3 je Versuchsgruppe aus 3 unabhängigen Experimenten.

MMP-1: Für MMP-1 zeigte sich sowohl durch IL-1 als auch durch die Kompression um 50% und die Kombination von IL-1 und Kompression tendenziell eine leichte Abnahme in allen Versuchsgruppen (**Abb. 16**).

MMP-2: Bei MMP-2 zeigte sich in der Versuchsgruppe die mit IL-1 kultiviert wurde, eine Zunahme der Expression um das 4 bis 8-fache, während die Kompression der Explantate keine Veränderung der Expression bewirkte.

Die Kombination aus Kompression und IL-1 lässt aufgrund der stark unterschiedlichen Werte in den Einzelexperimenten keine eindeutige Tendenz erkennen (**Abb. 16**).

MMP-3: MMP-3 reagierte auf die Inkubation mit IL-1 mit einer 18-fach erhöhten Expression im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die Kompression des Gewebes um 50% bewirkte eine einheitliche Abnahme der mRNA-Expression um den Faktor 8. Die Kombination von IL-1 und Kompression ergab eine Zunahme der Genexpression, die aber tendenziell geringer ausfiel als bei der IL-1-Gruppe (**Abb. 16**).

MMP-9: Für die Expression von MMP-9 zeigte die IL-1-Gruppe ohne Kompression eine tendenzielle Zunahme der Expression, die in den einzelnen Experimenten jedoch unterschiedlich stark ausfiel. Die Kompression um 50% ergab ebenfalls eine Zunahme in 2 Experimenten. Eine Kombination von IL-1 und Kompression zeigte ebenfalls eine, wenn auch schwächere, Zunahme der Genexpression von MMP-9 (**Abb. 16**).

MMP-13: Durch Inkubation mit IL-1 konnte die Expression von MMP-13 gegenüber der Kontrolle erheblich gesteigert werden. Die alleinige Kompression zeigte in dieser Versuchsreihe starke Unterschiede zwischen den einzelnen Experimenten, so dass sich hier keine eindeutige Tendenz erkennen ließ. Eine Kombination aus verletzender Kompression und IL-1 bewirkte einheitlich eine ähnlich hohe Expressionssteigerung wie in der IL-1-Gruppe ohne Kompression (**Abb. 16**).

ADAMTS-4: Die Genexpression der Aggrekanase ADAMTS-4 wurde durch den Zusatz von IL-1 gesteigert, wobei sich die Höhe der Zunahme aber in den Experimenten stark unterscheidet. Durch Kompression wurde eine geringere Genexpression gemessen. Die Kombination mit IL-1 zeigte eine mit der IL-1-Gruppe ohne Kompression vergleichbare Steigerung der Genexpression (**Abb. 16**).

ADAMTS-5: Eine Expression von ADAMTS-5 konnte in zwei Experimenten gemessen werden, es zeigte sich ein ähnliches Verhalten der Genexpression wie bei ADAMTS-4. Auch hier bewirkte IL-1 alleine und in Kombination mit der Kompression eine Zunahme der Expression.

Kollagen Typ II und Aggrekan: Es zeigte sich eine deutliche Abnahme der Genexpression durch IL-1. Die Kombination mit einer Kompression um 50% ergab eine ähnlich starke Abnahme wie durch IL-1 alleine. In der Kompressionsgruppe ließ sich für Kollagen Typ 2 und Aggrekan keine eindeutige Tendenz einer Expressionsveränderung erkennen (**Abb. 16**).

3.5.3. Einfluss von Antioxidantien und Kompression auf die mRNA-Expression

In dieser Versuchsreihe wurde die Wirkung von SOD und NAC in Kombination mit einer verletzenden Kompression auf die Genexpression von matrixdegradierenden Enzymen im Meniskusgewebe untersucht. In den Versuchsgruppen mit Zusatz von Antioxidantien wurde eine Konzentration im Medium von 2,5µM für SOD und 1mM für NAC verwendet. Die Kompression erfolgte einmalig mit einer Stärke von 60% und einer Geschwindigkeit von 1 mm/s.

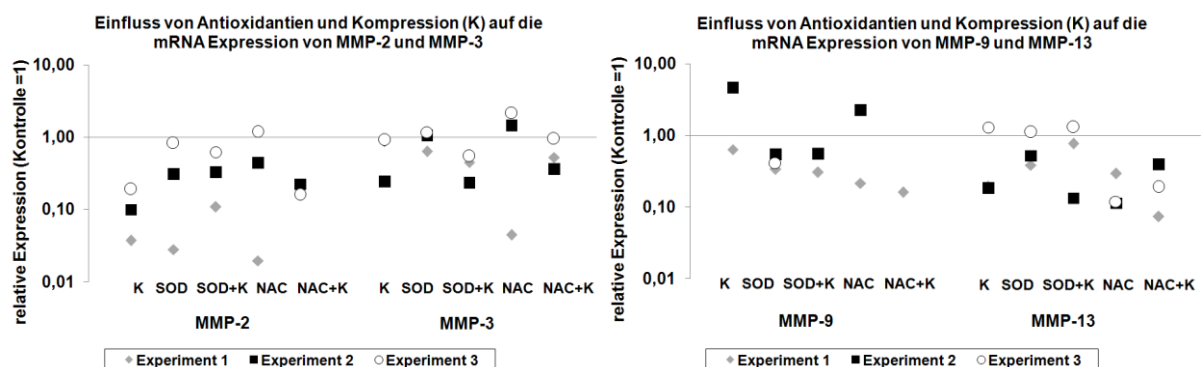


Abb. 17: Einfluss von Antioxidantien und Kompression auf die mRNA-Expression von MMP-2, -3, -9 und -13

Im Anschluss an eine dreitägige Inkubation wurde die mRNA-Expression von MMP-2, -3, -9 und -13 mit einer real time RT-PCR ermittelt (s. 2.2.6). **K** = 60% Kompression der Meniskusexplantate mit einer Geschwindigkeit von 1 mm/s. **SOD** = Zusatz von MnTMPyP (2,5µM) im Kulturmedium. **NAC** = Zusatz von N-Acetyl-Cystein (1mM) im Kulturmedium. Die mRNA Expression ist relativ zur unbehandelten Kontrolle (=1) logarithmisch dargestellt. n=3 je Versuchsgruppe aus 3 unabhängigen Experimenten.

Die Expression von MMP-2 wurde durch die einmalige Kompression verringert. Der Zusatz sowohl von SOD als auch von NAC zeigte hier in allen Versuchsgruppen eine marginale Abnahme der Expression sowohl alleine als auch in Kombination mit der Kompression. Für MMP-3 und -9 zeigen sich durch den Zusatz von SOD bzw. NAC eine im Vergleich zur Kontrolle uneinheitliche Veränderungen der Expression, die keine eindeutige Richtung erkennen lassen. MMP-13 wird durch den Zusatz von NAC vermindert exprimiert. Es lässt sich in allen Versuchsgruppen keine aussagekräftige Tendenz einer Beeinflussung in Relation zur Kontrollgruppe erkennen (**Abb. 17**).

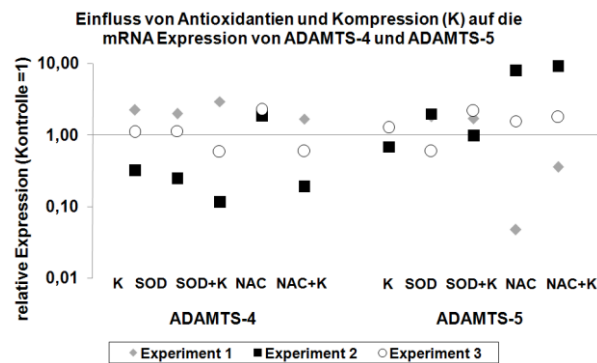


Abb. 18: Einfluss von Antioxidantien und Kompression auf die mRNA-Expression von ADAMTS-4 und ADAMTS-5

Im Anschluss an eine dreitägige Inkubation wurde die mRNA-Expression von ADAMTS-4 und -5 mit einer real time RT-PCR ermittelt (s. 2.2.6). **K** = 60% Kompression der Meniskusexplantate mit einer Geschwindigkeit von 1 mm/s. **SOD** = Zusatz von MnTMPyP (2,5uM) im Kulturmedium. **NAC** = Zusatz von N-Acetyl-Cystein (1mM) im Kulturmedium. Die mRNA Expression ist relativ zur unbehandelten Kontrolle (=1) logarithmisch dargestellt. n=3 je Versuchsgruppe aus 3 unabhängigen Experimenten.

Die Expression der Aggrekanasen ADAMTS-4 und ADAMTS-5 wurde durch den Zusatz von SOD und NAC nicht eindeutig beeinflusst. Die Ergebnisse der Einzelexperimente weisen zudem erhebliche Schwankungen auf (**Abb. 18**).

3.6. Untersuchungen zur Zellvitalität

3.6.1. Einfluss von Kompression und Antioxidantien auf die LDH-Aktivität

Mit dieser Versuchsreihe wurde ermittelt, welche Auswirkungen die verletzende Kompression um 60% der Explantatdicke auf die Aktivität der Laktatdehydrogenase (LDH) im Kulturüberstand hat. Eine erhöhte LDH-Konzentration in den Überständen ist ein Hinweis für Zelluntergang, da dieses Enzym physiologisch innerhalb der Zellen vorkommt. Des Weiteren wurde untersucht ob sich die LDH-Aktivität durch Zugabe von SOD (2,5µM) und NAC (1mM) beeinflussen lässt. Die Aktivität des Enzyms in den Überständen wurde mit Hilfe des "Cytotoxicity Detection Kit" nach dreitägiger Inkubation der Explantate gemessen (s. 2.2.5).

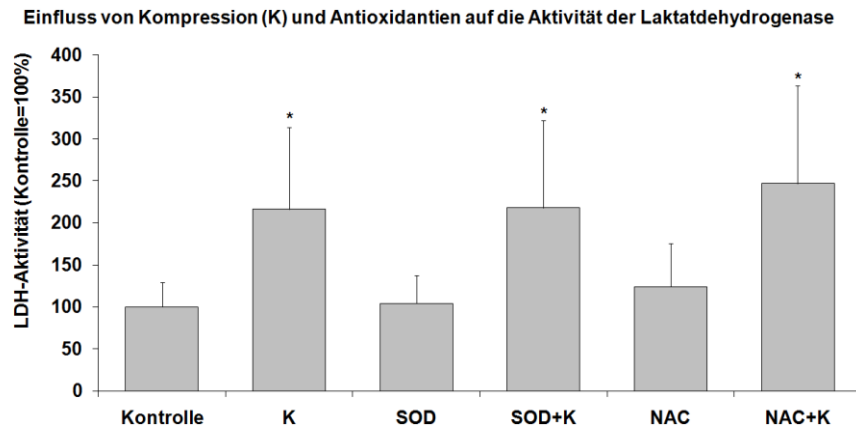


Abb. 19: Einfluss von Kompression und Antioxidantien auf die Aktivität der Laktatdehydrogenase

Die LDH-Aktivität in den Überständen wurde mit Hilfe des "Cytotoxicity Detection Kit" nach dreitägiger Inkubation der Explantate gemessen (s. **2.2.5**). **K** = Kompression der Meniskusexplantate um 60% mit 1 mm/s. **SOD** = Zusatz von MnTMPyP (2,5µM) im Kulturmedium. **NAC** = Zusatz von N-Acetyl-Cystein (1mM) im Kulturmedium. n=18 je Versuchsgruppe aus drei unabhängigen Experimenten. Darstellung der Mittelwerte in Prozent der Kontrolle + Standardabweichung. * = $p < 0,05$ der komprimierten Gruppen in Relation zu der jeweiligen Kontrolle.

Die LDH-Aktivität steigt durch verletzende Kompression im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle deutlich um 116%. Die Zugabe der Antioxidantien jedoch hat sowohl mit als auch ohne zusätzliche Kompression keinen signifikanten Einfluss auf die Enzymaktivität ergeben. Während die Zugabe von SOD nahezu keine Auswirkungen hatte, zeigte sich durch einen Zusatz von NAC sogar eine leichte Zunahme der LDH Aktivität um 24% gegenüber der Kontrolle. Eine Kombination von NAC und Kompression resultierte in einer um 31% erhöhten LDH-Aktivität verglichen mit der Versuchsgruppe, die nur mit NAC kultiviert wurde (**Abb. 19**).

3.6.2. Einfluss von Kompression und Antioxidantien auf den Zelltod

Die TUNEL-Färbung dient der Darstellung von Zellkernen abgestorbener oder absterbender Zellen. Bei dieser Untersuchung wurden je Versuchsgruppe vier histologische Schnitte aus vier unabhängigen Experimenten hergestellt und anschließend nach der TUNEL-Methode gefärbt (s. 2.2.7.2).

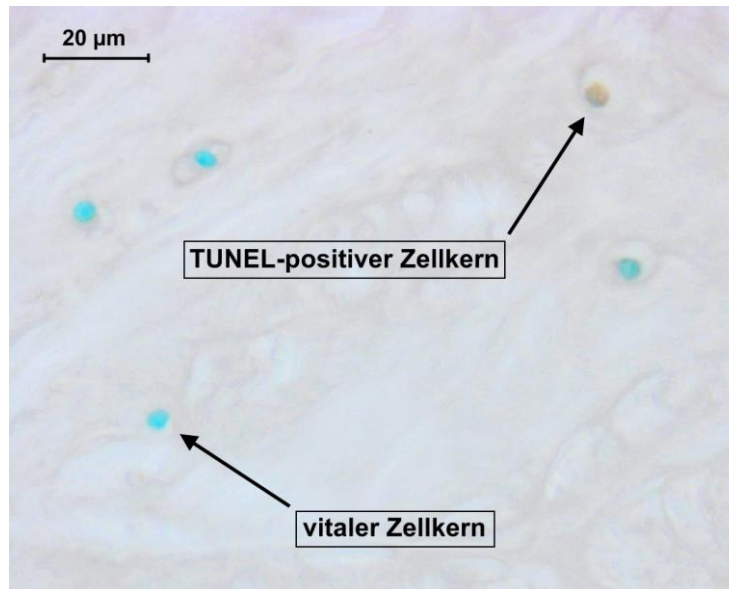


Abb. 20: Mikroskopische Darstellung von Zellkernen im Meniskusgewebe in der TUNEL-Färbung

An diesem histologischen Schnitt eines Explantats der nach der TUNEL-Methode angefärbt wurde (s. 2.2.7.2), lassen sich 5 Zellkerne der Faserknorpelzellen des bovinen Meniskusgewebes erkennen. Es kann dabei eindeutig zwischen braun angefärbten, TUNEL-positiven Zellkernen und noch vitalen grünen Zellkernen unterschieden werden.

Im Mikroskop wurden drei Gesichtsfelder aus der Mitte jedes Schnittes ausgezählt (n=12 je Versuchsgruppe). Die TUNEL-positiven Zellkerne zeigten dabei eine charakteristische braune Färbung während sich noch vitale Zellen grün darstellten. Je Gesichtsfeld waren im Mittel sieben Zellkerne zu erkennen (**Abb. 20**).

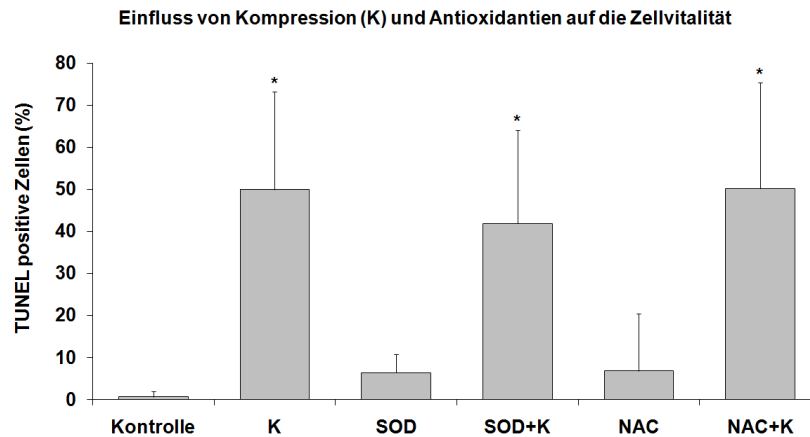


Abb. 21: Einfluss von Kompression und Antioxidantien auf die Zellvitalität

Im Anschluss an eine dreitägige Kultivierung wurden histologische Schnitte der Meniskusexplantate angefertigt (s. 2.2.7) und nach der TUNEL-Methode angefärbt (s. 2.2.7.2). **K** = 60% Kompression der Meniskusexplantate mit einer Geschwindigkeit von 1 mm/s. **SOD** = Zusatz von MnTMPyP (2,5uM) im Kulturmedium. **NAC** = Zusatz von N-Acetyl-Cystein (1mM) im Kulturmedium. Auszählung der angefärbten Zellkerne von 12 Gesichtsfeldern je Versuchsgruppe aus 4 unabhängigen Experimenten. Darstellung des Mittelwertes TUNEL-Positiver Zellen an der Gesamtzellzahl in Prozent + Standardabweichung. * = $p < 0,05$ der komprimierten Gruppen in Relation zur Kontrolle.

In der Kontrollgruppe waren 0,64% der ausgezählten Zellen TUNEL-positiv während eine Kompression in 49,94% TUNEL-positiven Zellen resultierte. Nach Zusatz von SOD ohne Kompression zeigten sich 6,38% der Zellen TUNEL-positiv, in Kombination mit einer Kompression waren es 41,89%. Ein Zusatz von NAC zeigte in der Versuchsgruppe ohne Kompression 6,82% TUNEL-positive Zellen, in Kombination mit einer Kompression erhöhte sich der Anteil auf 50,24%.

4. Diskussion

Für die physiologische Funktion und die Biomechanik im Kniegelenk spielen die Menisken eine entscheidende Rolle. Der Druckausgleich bei der Kraftübertragung von den Femurkondylen auf das Tibiaplateau ist dabei ihre wichtigste Funktion. Es ist bekannt, dass eine Überlastung des Meniskusgewebes zu einer Schädigung des Meniskusgewebes führt. Langfristig ist eine Degeneration des Gewebes eine häufige Folge. Entzündungsmediatoren wie z.B. Zytokine sowie vermehrter oxidativer Stress sind weitere Faktoren, die vor allem an Gelenkknorpelgewebe negative Effekte auf das Gewebe gezeigt haben und eine Rolle bei der Entstehung einer Osteoarthritis spielen können.

Da die genauen Auswirkungen von mechanischem Stress sowie die Reaktionen auf proinflammatorische Zytokine für das Meniskusgewebe weitgehend unbekannt sind, wurden in dieser Arbeit bovine Meniskusexplantate einer verletzenden Kompression unterzogen und in weiteren Versuchsreihen mit IL-1 sowie antioxidativen Substanzen behandelt.

4.1. In Vitro Kompression von Gelenkknorpel und Meniskus

Es existieren verschiedene Modelle für eine verletzende Kompression am Knorpelgewebe (Torzilli et al. 1999; Quinn et al. 1998; Jeffrey et al. 1997). Das in der vorliegenden Arbeit verwendete Protokoll zur verletzenden Kompression ist angelehnt an die Untersuchungen von (Kurz et al. 2001), die es für Versuche mit bovinen Gelenkknorpel etablierten. Andere Kompressionsmodelle induzieren eine Schädigung von Gelenkknorpel mit wiederholten Kompressionen (Loening et al. 2000) oder zyklischen Kompressionen über einen längeren Zeitraum (Chen et al. 1999).

Der Großteil der Untersuchungen zur Gewebekompression verwendet Gelenkknorpel als Material, während bisher kaum Ergebnisse zur mechanischen Kompression von Meniskusgewebe vorliegen. Für eine Belastung des Meniskus werden bis zu 5 - 10% axiale Kompression mit einem Druck von 3 MPa als physiologischer Bereich angesehen, wobei nach einer partiellen Meniskektomie diese Belastung auf etwa 20% ansteigen kann (Zielinska et al. 2006). Eine statische Kompression um 25% Gewebedicke resultiert in den Untersuchungen von Imler et al. (2004) in einer Abnahme der allgemeinen Proteinbiosynthese in Meniskusexplantaten und Zielinska et al. (2008) zeigen an einem anderen Kompressionsmodell, dass eine Kompression um 20% mit 1 Hz über 2 Stunden mit einem mittleren Gegendruck von $3,55 \pm 0,43$ MPa katabole Prozesse im Meniskusgewebe induzieren kann.

Es ist somit anzunehmen, dass schon die 25% Kompression bei den durchgeführten Versuchen eine pathologische Belastung des bovinen Meniskus darstellte. Es wurde dabei ein Gegendruck von $4,9 \pm 2,1$ MPa gemessen.

Für das gleiche in vitro Modell und bei Gelenkknorpelscheiben mit identischen Maßen wie in der vorliegenden Arbeit messen DiMicco et al. (2004) und Patwari et al. (2003) einen maximalen Gegendruck von 22-23 MPa bei einer Kompression um 50% mit 1 mm/s. Loening et al. (2000) messen einen Spitzendruck von 25 MPa bei 50% Kompression. In den hier durchgeführten Versuchen am Meniskus wurde bei 50% Kompression nur ein Druck von $11,2 \pm 3,8$ MPa ermittelt. Diese Differenz zwischen Meniskus und Gelenkknorpel kann einerseits darin begründet liegen, dass die Untersuchungen am Gelenkknorpel an unreifem Knorpel erfolgten, während das Meniskusgewebe der vorliegenden Studie von ausgewachsenen Rindern stammte. Die Differenz kann aber auch bestätigen, dass Meniskusgewebe eine andere physiologischen Funktion und somit andere biomechanische Eigenschaften hat als der Gelenkknorpel (Fithian et al. 1990; Proctor et al. 1989).

4.2. GAG-Verlust aus dem Meniskusgewebe

Eine verstärkte Freisetzung von Proteoglykanen gilt als sicherer Hinweis für eine Degeneration der EZM im Gelenkknorpel und Meniskusgewebe (McHenry et al. 2006; DiMicco et al. 2004; Caterson et al. 2000). Die verletzende Kompression der Meniskusexplantate bewirkte in der vorliegenden Arbeit einen signifikant erhöhten GAG-Verlust, dessen Höhe von der Kompressionsstärke abhängig war. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit mehreren Arbeiten die sich mit Gelenkknorpel befassen, bei denen durch eine verletzende Kompression mit einer Stärke von 50% und einer Geschwindigkeit von 1 mm/s ein GAG-Verlust induzieren ließ (DiMicco et al. 2004; Patwari et al. 2003; Kurz et al. 2001). Ein erhöhter GAG-Verlust durch Kompression zeigte sich auch an anderen Modellen zur verletzenden Kompression (Natoli et al. 2008; Jeffrey et al. 2007; Loening et al. 2000). Quinn et al. (2001) beschreiben zudem eine Korrelation zwischen vermehrtem GAG-Verlust bei zunehmender Kompressionsstärke. Aufgrund der vorliegenden Daten lässt sich also vermuten, dass sich Meniskusgewebe im Bezug auf den GAG-Verlust durch verletzende Kompression zunächst einmal ähnlich verhält wie der Gelenkknorpel.

Ein vermehrter GAG-Verlust durch mechanische Belastung von Meniskusgewebe wird ebenfalls von Shin et al. (2003) beschrieben, die jedoch mit einer dynamischen Kompression über 24 Stunden bei einem Druck von 0,1 MPa und einer Frequenz von 1Hz arbeiten, wodurch vermutlich keine unmittelbare Verletzung des Gewebes bewirkt wird.

Auch McHenry et al. (2006) zeigen an Meniskusexplantaten durch eine 2 stündige Kompression um 20% bei einer Frequenz von 1Hz eine Zunahme des GAG-Verlusts.

Eine Überlastung des Meniskusgewebes führt somit wie im Gelenkknorpel zu einer Degeneration der EZM, wobei Training im physiologischen Bereich zu einer Steigerung der Proteoglykansynthese führen kann (Vailas et al. 1986).

Es wurde weiterhin untersucht, welche Wirkung IL-1, das als proinflammatorisches Zytokin an der Destruktion von Gelenkknorpel durch die Induktion von matrixdegradierenden Enzymen (Little et al. 1999) und der vermehrten Bildung von NO beteiligt ist (Shin et al. 2003; Cao et al. 1998; Stadler et al. 1991), auf den GAG-Verlust im Meniskus hat. IL-1 bewirkt am Gelenkknorpel kontinuierlich einen stark erhöhten GAG-Verlust aus dem Gewebe (Pratta et al. 2003; Kozaci et al. 1997; van de Loo et al. 1995), welches in den durchgeführten Versuchen für Meniskusgewebe bestätigt wurde.

Die Zugabe von IL-1 zeigte in der vorliegenden Arbeit eine weitaus stärkere Zunahme des GAG-Verlusts im Vergleich zu verletzender Kompression. Die Kombination von IL-1 und der Verletzung zeigte aber keinen synergistischen Effekt auf den GAG-Verlust, sondern resultierte im Gegenteil in einer Verminderung der IL-1 Wirkung. Patwari et al. (2003) zeigten am Gelenkknorpel im Gegensatz zu diesen Ergebnissen eine Verstärkung des IL-1 Effektes durch eine 50% Kompression. In den Untersuchungen von Shin et al. 2003 bewirkte die Inkubation von Meniskusexplantaten mit IL-1 (1 ng/ml) ebenfalls eine Zunahme des GAG-Verlusts und eine zusätzliche dynamische Kompression (24h, 1 Hz, 0,1 MPa) führte zu einer weiteren Steigerung. Somit stehen die hier vorgestellten Befunde zum Meniskusgewebe im Gegensatz zu den Studien am Gelenkknorpelgewebe.

Weitere Erkenntnisse zur Wirkung von Kompression und IL-1 auf Meniskusgewebe liegen zum jetzigen Zeitpunkt nicht vor. In der vorliegenden Arbeit ist jedoch ein stark erhöhter Zelluntergang durch verletzende Kompression erkennbar. Dadurch kann man annehmen, dass das durch die Kompression verletzte Gewebe im Anschluss in geringerem Maße auf die Stimulation mit IL-1 reagieren konnte. Um diese Annahme zu bestätigen ist es sicherlich sinnvoll in zukünftigen Studien einen quantitativen Nachweis des IL-1 Rezeptors im Anschluss an eine Verletzung des Gewebes durchzuführen und mehr Daten über die Aktivität oder Aktivierbarkeit der Zellen im verletzten Gewebe zu erheben.

Es wurde außerdem untersucht, ob die antioxidativ wirksamen Substanzen SOD und NAC einen Einfluss auf den, durch die Kompression induzierten GAG-Verlust haben. Homandberg et al. (1996) konnten zeigen, dass eine durch Fibronectin induzierte GAG-Verlust am Gelenkknorpel durch die Zugabe von NAC (1 mM) verringert werden kann.

Fukuda et al. (1994) zeigen jedoch im Gegensatz dazu, dass der GAG-Verlust aus Gelenkknorpel durch die rekombinante Superoxidismutase nicht zu beeinflussen ist.

Zu der Wirkung von Antioxidantien auf einen durch eine mechanische Kompression verursachten GAG-Verlust am Meniskus gibt es bisher keine Erkenntnisse.

Leider liefern auch die hier gewonnenen Ergebnisse keinen Anhalt für eine schützende Wirkung dieser Substanzen auf die Degeneration der EZM im Meniskusgewebe.

Der in der vorliegenden Arbeit durch die Kompression verursachte GAG-Verlust lässt sich nicht auf eine vermehrte Synthese matrixdegradierender Enzyme zurück führen, da diese eher eine verminderte mRNA-Expression nach Kompression aufwiesen. DiMicco et al. (2004) beschreiben am gleichen In vitro Modell zur mechanischen Verletzung bei Gelenkknorpel einen erhöhten GAG-Verlust in den ersten 24 h nach einmaliger Kompression (50%, 1mm/s), der nicht durch Hemmung der MMPs, Agrekanasen und der generellen Biosynthese der Knorpelzellen beeinflussbar war. Erst nach mehr als 24 Stunden ließ sich der GAG-Verlust durch MMP-Inhibitoren reduzieren. Sie stellen die Hypothese auf, dass dieser initiale GAG-Verlust nicht durch zellvermittelte Prozesse einschließlich aktiver Biosynthese bedingt ist. Es ist daher wahrscheinlich, dass auch der GAG-Verlust in den hier durchgeführten Untersuchungen nicht durch aktive enzymatische Prozesse, sondern durch eine mechanische Zerstörung der EZM und anschließende, passive Diffusion der Proteoglykane in das Kulturmedium bedingt ist. Letztlich ist aber der genaue Nachweis hier noch offen, da die matrix-abbauenden Enzyme nicht nur über ihre Expression reguliert werden, sondern ein bereits bestehender Pool durch Stimulation mit Cytokinen oder Kompression aktiviert werden kann. Diese wurde zum Beispiel für Aggrekanaseaktivitäten am Gelenkknorpel gezeigt (Patwari et al. 2005) und könnte so auch am Meniskusgewebe vorkommen.

4.3. NO-Freisetzung aus dem Meniskusgewebe

Neben vielen physiologischen Aufgaben in der Signaltransduktion ist NO in erhöhten Konzentrationen im Gelenkknorpel für die Hemmung der Proteoglykan- und Kollagensynthese (Hauselmann et al. 1994; Taskiran et al. 1994), die Induktion von Matrix-degradierenden Enzymen sowie einer vermehrten Apoptose von Chondrozyten verantwortlich (Sasaki et al. 1998; Murrell et al. 1995; Blanco et al. 1995).

Welche Wirkung eine verletzende Kompression in Kombination mit IL-1 auf die NO-Freisetzung aus dem Meniskusgewebe hat, wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht.

Die Kompression bewirkte hier eine Abnahme der NO-Freisetzung in das Kulturmedium. Diese Abnahme war bereits bei einer Kompression um 25% messbar und nahm bei 50% Kompression weiter zu.

Im Unterschied zu den vorliegenden Ergebnissen haben mehrere Arbeiten gezeigt, dass mechanischer Stress die NO-Produktion im Knorpel und Meniskusgewebe erhöht (Gupta et al. 2008; Fermor et al. 2004; Lee et al. 2002; Loening et al. 2000; Das et al. 1997). Eine durch IL-1 stark gesteigerte NO-Produktion wurde für Gelenkknorpel- und Meniskusgewebe schon mehrfach beschrieben und dieses konnte hier für bovine Meniskusexplantate bestätigt werden (LeGrand et al. 2001; Cao et al. 1998; Hauselmann et al. 1994).

Eine Kombination von IL-1 mit der verletzenden Kompression zeigte allerdings eine Abnahme der NO-Freisetzung im Vergleich mit der Versuchsgruppe, der nur IL-1 zugesetzt wurde. Tsuang et al. (2008) bewirkten an Meniskusexplantaten durch eine Kompression um 15% (1Hz über 24h) eine Reduktion der NO-Produktion und (Chowdhury et al. (2008; 2001) zeigen durch Kompression von Knorpelzellen eine Verringerung der IL-1 Wirkung auf die NO-Produktion. Gemeinsam ist diesen beiden Arbeiten jedoch, dass sie eine physiologische Belastung und keine Verletzung des Gewebes simulieren. Fink et al. (2001) beschreiben zum einen eine durch dynamische Kompression gesteigerte NO-Freisetzung, zum anderen aber auch, dass die spontane NO-Produktion von unbehandeltem Meniskusgewebe nach 48 h Inkubation sistiert.

In der vorliegenden Arbeit wurde die NO-Konzentration nach dreitägiger Inkubation im Anschluss an die Kompression gemessen. Dieses lässt vermuten, dass die durch die Kompression geschädigten Explantate schon initial nicht die gleiche Menge NO synthetisieren konnten, wie die Kontrollgruppe und somit die verringerte Endkonzentration durch die mechanische Zellschädigung bedingt ist. Für diese Annahme spricht auch die verminderte Reaktion der komprimierten Explantate auf die Stimulation mit IL-1, ein Effekt, der auch schon in den Untersuchungen zum GAG-Verlust zu beobachten war. Gelenkknorpel scheint jedoch auch im Anschluss an eine verletzende Kompression mit vermehrtem Zelltod zu einer erhöhten NO-Synthese fähig zu sein (Loening et al. 2000).

Es bleibt somit unklar, ob die in der vorliegenden Arbeit gezeigte verringerte NO-Produktion nach mechanischer Verletzung Ausdruck eines stark Zell-geschädigten Gewebes ist, das nicht mehr auf Signale reagieren kann, oder Ausdruck einer Schutzhaltung ist, die eine weitere Zerstörung des Gewebes verhindern soll. Gupta et al. (2008) zeigen an Schweinemenisken, dass eine Kompression um 20% die Expression der iNOS sowie die Freisetzung von NO erhöht.

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen bei 25% Kompression eine Abnahme der NO-Freisetzung, die statistisch jedoch nicht signifikant ist. Hierbei könnte eine Expressionsmessung der iNOS im Anschluss an eine verletzende Kompression weitere Erkenntnisse liefern.

Desweiteren wurden die komprimierten Meniskusexplantate mit den Antioxidantien SOD und NAC stimuliert und die Auswirkungen auf die NO-Freisetzung ermittelt. Fukuda et al. (1994) zeigen, dass eine IL-1 vermittelte Steigerung der NO-Freisetzung im Meniskus durch Zusatz von rekombinanter humaner Superoxiddismutase signifikant gehemmt werden kann. Der Zusatz von SOD ergab in der vorliegenden Studie keine signifikante Beeinflussung sowohl der basalen NO-Freisetzung, als auch in der Versuchsgruppe, die einer verletzenden Kompression unterzogen wurde.

Der Zusatz von NAC bewirkte jedoch eine starke Steigerung der NO-Freisetzung, die durch verletzende Kompression sogar noch weiter gesteigert werden konnte. Bei Untersuchungen zur Wirkung von NAC auf Gefäßwände hat sich gezeigt, dass es die Reaktion von Superoxid mit NO zu Peroxynitrit inhibiert, welches in einer erhöhten NO-Konzentration resultierte (Zafarullah et al. 2003). Am Gelenkknorpel beschreiben Mathy-Hartert et al. (2002) in Zellkulturen eine Verstärkung der NO-Freisetzung unter Zugabe von NAC. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass NAC, welches in anderen Studien eine Verminderung von Apoptose im Gelenkknorpel gezeigt hat (Beecher et al. 2007), unerwünschte Nebeneffekte auf die NO-Synthese haben könnte, indem es in durch die Kompression geschädigten Gewebe noch eine erhöhte NO-Produktion bewirken kann.

Es gibt keine weiterführenden Studien zu der Wirkung von NAC und SOD auf die NO-Produktion im Meniskusgewebe. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen jedoch, dass diese Antioxidantien keine positiven Effekte auf verletztes Meniskusgewebe haben und im Fall von NAC sogar schädigend wirken können. Die Steigerung der NO-Freisetzung unter NAC-Einfluss zeigt allerdings, dass das Meniskusgewebe trotz Verletzung noch zu einer Steigerung der NO-Synthese fähig ist und somit nicht generell alle Zellfunktionen nach Verletzung reduziert sind.

4.4. Expression matrixdegradierender Enzyme im Meniskusgewebe

Den MMPs und Aggrekanasen kommt eine entscheidende Bedeutung bei der Degeneration von Gelenkknorpel und Meniskusgewebe zu, welche mit einem Abbau von Proteoglykanen und Kollagenen in der EZM einhergeht (Burrage et al. 2006; Nagase et al. 2003).

Eine verletzende Kompression der bovinen Meniskusexplantate resultierte in der vorliegenden Arbeit in der Regel mit einer dosisabhängigen Verringerung der mRNA-Expression von MMP-2 und -3. Auch die Expression von ADAMTS-4 wurde durch die Kompression vermindert, während für ADAMTS-5 vereinzelt eine Induktion messbar war. Bei den anderen untersuchten Enzymen (MMP-1, -9, -13) bewirkte die Kompression keine eindeutigen Veränderungen.

Diese Ergebnisse stehen im Gegensatz zu Erkenntnissen am Gelenkknorpel. Patwari et al. (2001) konnten durch verletzende Kompression eine signifikante Steigerung der mRNA-Synthese von MMP-3 induzieren und Lee et al. (2005) bewirkten an Gelenkknorpel-explantaten durch eine einmalige Kompression um 50% mit einer Geschwindigkeit von 1 mm/s eine Zunahme der Expression von MMP-1, -9 und -13.

Auch für Meniskusgewebe konnte in einer aktuellen Untersuchung an Schweinememenisken gezeigt werden, dass durch eine mechanische Kompression um 20%, jedoch über 2 Stunden mit einer Frequenz von 1 Hz, die Expression von MMP-1, -3, -13 und ADAMTS-4 gesteigert werden kann (Zielinska et al. 2008). Inwiefern diese abweichenden Ergebnisse am Meniskus durch Speziesunterschiede oder durch das unterschiedliche Kompressionsmodell zu erklären sind, gilt es in Zukunft zu untersuchen. Die Ursache der verringerten Expression in den vorliegenden Versuchen ist unklar und ist nicht mit der allgemeinen Abnahme der Zellvitalität erklärbar, da nur einzelne Proteinase von der Kompression überhaupt beeinflusst wurden. Es liegen keine weiteren Erkenntnisse zu dieser Fragestellung vor, so dass hier Anschlussstudien im direkten Vergleich zum Gelenkknorpel weitere Erkenntnisse liefern könnten.

Der Zusatz von IL-1 führte bei den vorliegenden Untersuchungen zu einem starken Anstieg der Expression von MMP-2, -3, -9 und -13 stimmt somit mit den Erkenntnissen zum Gelenkknorpel überein, bei denen durch IL-1 eine erhöhte Expression von MMP-1, -3 und -9 und -13 induziert werden konnte (Aida et al. 2005; Flannery et al. 1999; Lefebvre et al. 1991). Dieses zeigt auch, dass die Meniskusexplantate prinzipiell bei geeigneter Stimulation zu einer Erhöhung der mRNA-Expression befähigt sind.

Stevens et al. (2009) zeigten in einer aktuellen Untersuchung am gleichen in vitro Modell zur verletzenden Kompression (50 %, 1 mm/s) am Gelenkknorpel eine Induktion von MMP-1, -3, -9 und -13 sowohl durch die Kompression als auch durch Zusatz von IL-1.

Es gibt teilweise konträre Untersuchungsergebnisse in welchem Umfang ADAMTS-4 und -5 an der Degeneration der Matrix im Gelenkknorpel beteiligt sind. Es ist mehrfach beschrieben, sowohl an humanem als auch bovinem Gelenkknorpel, dass eine vermehrte Expression von ADAMTS-4 u.a. durch IL-1 induziert werden kann, während die Expression von ADAMTS-5 dabei weitgehend unverändert bleibt (Pratta et al. 2003; Bau et al. 2002; Tortorella et al. 2001). Bondeson et al. (2006) bewirkten durch eine Blockade der Wirkung von IL-1 eine Hemmung der ADAMTS-4, jedoch nicht der ADAMTS-5 Expression in humanen Synovialzellen. Stanton et al. (2005) hingegen konnten durch IL-1 eine Induktion von ADAMTS-5 ohne eine Veränderung der Expression von ADAMTS-4 in Gelenkknorpel von Mäusen nachweisen.

Im Kontrast dazu zeigen andere Studien eine Wirkung von IL-1 auf die Expression von beiden Aggrecanasen sowohl in bovinem als auch humanem Knorpelgewebe (Song et al. 2007; Little et al. 2002) und die vorliegenden Versuche bestätigen eine Induktion sowohl von ADAMTS-4 als auch ADAMTS-5 durch IL-1 in bovinem Meniskusgewebe.

Eine zusätzliche Kompression resultierte in keiner Beeinflussung der IL-1 Wirkung auf die Expression der MMPs und Aggrecanasen. Auch der Zusatz der Antioxidantien SOD und NAC ließ bei den durchgeführten Versuchen keine eindeutige Tendenz einer Auswirkung auf die Expression erkennen. Hier ist für zukünftige Studien sicherlich eine Kombination der Antioxidantien mit IL-1 interessant, zudem müssten Dosiswirkungskurven erstellt werden, da bislang die Untersuchungen mit Konzentrationen an Antioxidantien durchgeführt wurden auf Studien an Gelenkknorpelproben basieren. Die wichtigen Bestandteile der extrazellulären Matrix, Kollagen Typ 2 und Aggrecan, wurden in den durchgeführten Versuchen durch IL-1 in ihrer Expression gehemmt, was auch in anderen Studien bereits gezeigt wurde (Richardson et al. 2000; Lefebvre et al. 1990; Goldring et al. 1988) und unterstützen somit diese Daten.

Aufgrund der Studienlage zur Induktion und Aktivität der Aggrecanasen, sind weitere Untersuchungen, vor allem an humanem Gewebe erforderlich, da hier erhebliche Speziesunterschiede bestehen könnten. Erkenntnisse über die Aktivität und Regulation der Aggrecanasen sind von besonderer Bedeutung, da sie als potentiell erfolgsversprechende Ziele für eine gezielte, pharmakologische Behandlung der Osteoarthritis angesehen werden (Gilbert et al. 2008; Wittwer et al. 2007; Cherney et al. 2003).

4.5. Abnahme der Zellvitalität im Meniskusgewebe durch verletzende Kompression

4.5.1. Nachweis von Zelltod in der TUNEL-Färbung

Es hat sich gezeigt, dass die durchgeführte einmalige Kompression mit einer Stärke von 60% in einer deutlich erhöhten Anzahl untergegangener Zellen resultierte. Nahezu 50% der Zellen waren TUNEL-positiv. Die TUNEL-Färbung ermöglicht allerdings keine Differenzierung zwischen Apoptose und Nekrose (Grasl-Kraupp et al. 1995). Somit lässt sich für die vorliegenden Ergebnisse nur ein eindeutiger Zelluntergang durch verletzende Kompression feststellen.

Da die Zellen gerade im Meniskus nur einen Bruchteil der Gewebemasse ausmachen und sie für die Synthese der umgebenden EZM verantwortlich sind, muss man davon ausgehen, dass eine solche Verletzung zu einer Schädigung des Gewebes führt und die Degeneration fördert. Mehrere in vitro Modelle haben gezeigt, dass sich durch unterschiedliche Kompressionsformen ein Zelluntergang im Gelenkknorpel induzieren lässt (Beecher et al. 2007; Chen et al. 2001; Loening et al. 2000). Für Gelenkknorpel gilt ein vermehrter Zelluntergang als ein kausaler Faktor in der Pathogenese der Osteoarthritis (Hashimoto et al. 1998; Blanco et al. 1998). Hashimoto et al. (1999) zeigten an Hasenmenisken, dass mechanische Überlastung zu einem vermehrten Zelluntergang führt und Uysal et al. (2008) konnten auch am menschlichen Meniskus einen Zusammenhang zwischen Meniskusrissen und erhöhten Apoptoseraten feststellen. Eine partielle Meniskektomie führte im Tiermodell sowohl im Meniskus als auch dem Gelenkknorpel zu erhöhtem vermehrtem Zelluntergang durch Apoptose (Kobayashi et al. 2001). Somit scheint der Zelltod ein wichtiger Parameter zu sein, dem bei der Degeneration von Meniskusgewebe Bedeutung zukommt.

Es hat sich gezeigt, dass ein Mechanismus, der zum programmierten Zelltod führt, über reaktive Sauerstoff Moleküle (ROS) und dabei vor allem Hyperoxide vermittelt werden kann (Cai et al. 1998; Sandstrom et al. 1994). In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob die Antioxidantien SOD und NAC einen Einfluss auf den Zelluntergang in mechanisch verletztem Meniskusgewebe haben. Kurz et al. (2004) konnten in Versuchen mit Gelenkknorpel am gleichen in vitro Modell (50% Kompression mit 1 mm/s), eine nach verletzender Kompression erhöhte Apoptoserate durch den Zusatz von 2,5mM SOD signifikant hemmen. Beecher et al. (2007) zeigten eine Hemmung der Apoptose von Chondrozyten nach dynamischer Kompression durch NAC und SOD. Es ergaben sich bei den hier durchgeführten Versuchen

durch SOD und NAC jedoch schon marginale Zunahmen TUNEL-positiver Zellen, in den Versuchsgruppen, die keiner Kompression unterzogen wurden.

Der Rückgang der TUNEL-positiven Zellen bei Zusatz von SOD in Kombination mit der Kompression kann somit nicht als eine aktive Hemmung bewertet werden. Auch NAC konnte den Zelluntergang nach der Kompression nicht beeinflussen. Aufgrund dieser Ergebnisse lässt sich vermuten, dass der auftretende Zelltod in bovinem Meniskus nach einer verletzenden Kompression zum Großteil auf Nekrose durch eine mechanische Zerstörung der Zellen und nicht auf Apoptose beruht. Dass die Antioxidantien in den Kontrollgruppen einen vermehrten Zelltod zu induzieren scheinen, wenn auch nur marginal, kann durch die vorliegenden Erkenntnisse nicht erklärt werden und bedarf weiterer Untersuchungen.

4.5.2. LDH-Aktivität im Kulturmedium

Die Laktatdehydrogenase (LDH) ist ein stabiles Enzym, welches im Zytoplasma aller Zellen des Körpers vorkommt. LDH katalysiert die Reaktion von Laktat zu Pyruvat und reduziert dabei NAD^+ zu NADH/H^+ . Es wird in Kulturmedium oder auch in vivo im Blut in erhöhten Konzentration gemessen, wenn es zu einem vermehrten Zelltod oder einem erhöhten Zellumsatz kommt. Bei in vitro Untersuchungen ist die LDH Konzentration ein verlässlicher Indikator für Zellschäden. Am Gelenkknorpel lässt sich durch mechanische Überlastung ein Anstieg der LDH-Aktivität im Überstand induzieren (Bush et al. 2005) und in osteoarthrotische Veränderungen in Gelenken korrelieren mit einer erhöhten LDH-Aktivität in der Synovialflüssigkeit (Pejovic et al. 1992; Weh et al. 1983).

In der vorliegenden Arbeit wurde diese Messung genutzt, um die Auszählung der TUNEL-Färbung zu belegen. Es hat sich ein deutlicher Anstieg der LDH-Aktivität durch die verletzende Kompression gezeigt. Die verletzende Kompression bewirkt somit auch hier eine vermehrte Zellschädigung und möglicherweise auch Zelltod im Meniskusgewebe und bestätigt damit die Auszählungen der TUNEL-Färbung.

Der Zusatz von SOD im Kulturmedium zeigte wie auch in der TUNEL-Färbung keine signifikanten Auswirkungen. Die Zugabe von NAC resultierte sogar in einer weiteren Zunahme der LDH-Aktivität im Überstand die jedoch nicht mit den Ergebnissen der TUNEL-Färbung korreliert und mit den vorliegenden Methoden nicht zu erklären ist.

4.6. Schlussfolgerung und Ausblick

Die vorliegende Arbeit untersucht die Wirkung von einer einmaligen verletzenden Kompression mit oder ohne Kombination mit IL-1 auf bovines Meniskusgewebe. Weiterhin sollten mit Hilfe von Antioxidantien die möglichen Auswirkungen der Stimuli beeinflusst werden. Es hat sich gezeigt, dass durch eine verletzende Kompression von Meniskusgewebe dosisabhängig ein erhöhter Zelluntergang und eine vermehrte Freisetzung von Proteoglykanen aus der EZM induziert werden. Diese Ergebnisse sind vergleichbar mit der allgemeinen Studienlage zum Gelenkknorpel. Die Kompression führte jedoch zu einer Abnahme der NO-Produktion sowie einer verringerten Expression von MMP-2, -3 und der Aggrecanase ADAMTS-4. Diese Erkenntnisse stehen im Gegensatz zu vielen Untersuchungen mit Gelenkknorpel und lassen vermuten, dass die mechanische Schädigung, anders als im Gelenkknorpel, die Meniskuszellen in ihrer Fähigkeit auf Reize zu reagieren reduziert.

Die Wirkung von IL-1, die zu einer Steigerung der GAG-Verluste und NO-Produktion sowie der Induktion von MMP-2, -3, -9, -13, ADAMTS-4 und -5 führte, bestätigt mit den vorliegenden Daten die Erkenntnisse am Gelenkknorpel. IL-1 kann die Synthese der iNOS verstärken, was in einer Erhöhung der NO-Produktion resultiert (Abramson et al. 2001; Palmer et al. 1993). NO wiederum kann im Gelenkknorpel die vermehrte Expression von MMPs induzieren (Sasaki et al. 1998; Tamura et al. 1996; Murrell et al. 1995).

Man kann bei den vorliegenden Ergebnissen vermuten, dass die Abnahme der NO-Synthese durch die verletzende Kompression zum Teil auf einen vermehrten Zelluntergang zurückzuführen ist. Für eine Abnahme der Syntheseleistung spricht auch, dass die komprimierten Explantate in geringerem Maße auf eine Stimulation mit IL-1 reagieren konnten, was zu verringerten GAG-Verlusten und NO-Produktion im Vergleich zur nicht komprimierten IL-1 Gruppe führte. Unter Annahme des genannten Einflusses von NO auf die Expression von MMPs lässt sich der Rückgang der Genexpression nach der Kompression eventuell über eine verminderte Induktion durch NO erklären. Der Zusatz von NAC zeigte jedoch, dass das Gewebe durchaus noch in der Lage zu sein scheint auf NO-induzierende Substanzen zu reagieren. Die Expression der Proteinasen unter Einfluss von IL-1 wurde jedoch durch die zusätzliche Kompression nicht deutlich beeinflusst obwohl die NO-Produktion dadurch verringert wurde. Trotz der verminderten NO-Produktion wurden nur MMP-2, -3 und ADAMTS-4 von der Kompression gehemmt.

In Zukunft sollten weitere Untersuchungen zur allgemeinen Biosyntheseaktivität im Anschluss an eine Kompression durchgeführt werden, um die oben genannten Annahmen zu bekräftigen. Zudem sollten die Aktivierbarkeit der Meniskuszellen sowie die Art des Zelltods nach mechanischer Verletzung noch detaillierter untersucht werden, um gegebenenfalls doch noch Möglichkeiten zu identifizieren, die den Gewebeuntergang nach Verletzung aufhalten oder vermindern können.

5. Zusammenfassung

Einleitung: Verletzungen der Kniegelenksmenisken können degenerative Veränderungen des Meniskusgewebes zur Folge haben und zum Entstehen einer sekundären Osteoarthritis beitragen. Im Gelenkknorpel führen sowohl eine mechanische Überlastung als auch der Einfluss proinflammatorischer Zytokine (u.a. Interleukin-1) zu einer Induktion von matrixdegradierenden Enzymen (Matrixmetalloproteinasen, Aggrecanasen), zum Abbau der für die Gewebefunktion essentiellen extrazellulären Matrix durch einen Verlust von Glykosaminoglykanen sowie zur vermehrten Synthese von Stickoxid (NO) als reaktive Sauerstoffspezies mit katabolen Eigenschaften. Daher wurde in dieser Arbeit ein, für den Gelenkknorpel bereits bewährtes, in vitro Modell zur verletzenden Kompression auf bovinen Meniskusgewebe etabliert, um neue Erkenntnisse für die Ursachen der posttraumatischen Degeneration zu gewinnen sowie eine mögliche Beeinflussung aufzuzeigen.

Methoden: Aus bovinen Menisken wurden einzelne Explantate (Durchmesser 3 mm, Höhe 1 mm) hergestellt und in einer computergesteuerten Druckkammer einer einmaligen Kompression (10 s mit 1 mm/s) unterzogen. Dabei betrug die Stärke der Kompression je nach Versuchsreihe zwischen 25% und 75% der Explantatdicke. Anschließend wurden die Explantate für eine Dauer von 3 Tagen bei 37 °C in Kulturmedium inkubiert und danach Untersuchungen am Überstand und den Gewebeproben durchgeführt.

Ergebnisse: Die Zell-verletzende Wirkung der Kompression konnte histologisch durch einen massiven Zelluntergang (TUNEL-Färbung), sowie eine deutlich erhöhte Konzentration der Laktatdehydrogenase im Kulturmedium (Cytotoxicity Detection Kit) nachgewiesen werden. Die Kompression der Explantate bewirkte zudem dosis-abhängig einen Verlust von Glykosaminoglykanen aus dem Gewebe (DMMB-Test) sowie eine Abnahme der NO-Produktion (Griess-Reaktion). Die mRNA-Expression der Matrixmetalloproteinasen MMP-2 und -3 sowie der Aggrecanase ADAMTS-4 wurden durch die Kompression gehemmt (real time RT-PCR). Das Gewebe wurde in Parallelversuchen mit IL-1 (10 ng/ml) stimuliert, was zu einer starken Zunahme des GAG-Verlustes und der NO-Produktion führte. Eine Kombination von Kompression und IL-1 reduzierte diese IL-1-Wirkungen jedoch. IL-1 induzierte weiterhin eine verstärkte Expression von MMP-2, -3, -9, -13 sowie ADAMTS-4 und -5. Aggrecan und Kollagen Typ II als Substrate dieser Enzyme wurden durch IL-1, aber nicht durch die Kompression in ihrer Synthese gehemmt.

Als Grundlage für eine mögliche therapeutische Beeinflussung wurde untersucht, ob die schädigenden Effekte der Kompression durch Zugabe von Antioxidantien (MnTMPyP = SOD-Mimetikum, N-Acetyl-Cystein) beeinflusst werden können. Der Zusatz von SOD und NAC zu komprimierten Explantaten zeigte jedoch keine Resultate, die auf eine protektive

Wirkung für die Meniskuszellen oder die extrazelluläre Matrix schließen lassen. NAC bewirkte im Gegenteil sogar eine signifikante Steigerung der NO-Synthese, die durch die Kompression noch verstärkt wurde.

Es wurden weiterhin die Gegendruckdaten ausgewertet, die während der Kompression durch das komprimierte Meniskusgewebe aufgebaut wurden. Hier zeigte sich im Vergleich zu Arbeiten am bovinen Gelenkknorpel mit dem gleichen Kompressionsmodell (50%, 1mm/s) ein geringerer Maximaldruck, der für eine geringere Druckelastizität des Meniskusgewebes spricht.

Diskussion: Die Abnahme der Expression von MMP-2 und -3 und vor allem die verminderte NO-Produktion in der vorliegenden Arbeit stehen im Gegensatz zu Studien mit verletzender Kompression am Gelenkknorpel, während die Resultate mit Zusatz von Interleukin-1 mit der Wirkung auf Gelenkknorpel vergleichbar sind. Dies zeigt, dass das Meniskusgewebe eine völlig andere Zellantwort auf mechanische Verletzung zeigt als der Gelenkknorpel und somit einer weiteren Erforschung bedarf. Da nicht alle Enzyme durch die Verletzung in ihrer Expression gehemmt wurden, kann dieser Effekt durch eine Abnahme der allgemeinen Biosynthese allein nicht erklärt werden, und wie der Zusatz von NAC zeigt, scheint das Meniskusgewebe nach der Kompression noch in der Lage zu sein, auf NO-induzierende Agentien mit einer verstärkten Synthese zu reagieren, was auch in weiterführenden Studien erforscht werden muss. Auch die Art des ermittelten Zelltods nach mechanischer Verletzung bleibt unklar und muss noch detaillierter untersucht werden.

Schlussfolgerung: Somit konnte in der vorliegenden Arbeit ein Modell etabliert werden, das dosis-abhängig Einflüsse einer mechanischen Verletzung auf das Meniskusgewebe zeigt, die anders sind, als im Gelenkknorpel. Da diese Effekte aber durch den Zusatz von Antioxidantien nicht im Sinne einer Protektion moduliert werden konnten, hat dieses in vitro-Modell noch nicht den gewünschten Erfolg erbracht, Wege aufzuzeigen, mit denen eine mechanisch-induzierte Verletzung des Meniskus in ihrer Auswirkung therapeutisch behandelt werden kann. Daher sollte weiter nach Substanzen gesucht werden, die die mechanisch-induzierte Schädigung des Meniskusgewebes minimieren können.

6. Literaturverzeichnis

- Abbaszade, I, Liu, R Q, Yang, F, Rosenfeld, S A, Ross, O H, Link, J R, Ellis, D M, Tortorella, M D, Pratta, M A, Hollis, J M, Wynn, R, Duke, J L, George, H J, Hillman, M C, Jr., Murphy, K, Wiswall, B H, Copeland, R A, Decicco, C P, Bruckner, R, Nagase, H, Itoh, Y, Newton, R C, Magolda, R L, Trzaskos, J M, Burn, T C, and .** Cloning and characterization of ADAMTS11, an aggrecanase from the ADAMTS family. 1999; J.Biol.Chem. (274): 23443-23450.
- Abramson, S B, Attur, M, Amin, A R, and Clancy, R.** Nitric oxide and inflammatory mediators in the perpetuation of osteoarthritis. 2001; Curr.Rheumatol.Rep. (3): 535-541.
- Adams, M E and Muir, H.** The glycosaminoglycans of canine menisci. 1981; Biochem.J. (197): 385-389.
- Ahmed, A M and Burke, D L.** In-vitro measurement of static pressure distribution in synovial joints--Part I: Tibial surface of the knee. 1983; J.Biomech.Eng (105): 216-225.
- Aida, Y, Maeno, M, Suzuki, N, Shiratsuchi, H, Motohashi, M, and Matsumura, H.** The effect of IL-1beta on the expression of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of matrix metalloproteinases in human chondrocytes. 2005; Life Sci. (75): 3173-3184.
- AufderHeide, A C and Athanasiou, K A.** Mechanical stimulation toward tissue engineering of the knee meniscus. 2004; Ann.Biomed.Eng (32): 1161-1174.
- Baker, A H, Edwards, D R, and Murphy, G.** Metalloproteinase inhibitors: biological actions and therapeutic opportunities. 2002; J.Cell Sci. (115): 3719-3727.
- Baratz, M E, Fu, F H, and Mengato, R.** Meniscal tears: the effect of meniscectomy and of repair on intraarticular contact areas and stress in the human knee. A preliminary report. 1986; Am.J.Sports Med. (14): 270-275.
- Bau, B, Gebhard, P M, Haag, J, Knorr, T, Bartnik, E, and Aigner, T.** Relative messenger RNA expression profiling of collagenases and aggrecanases in human articular chondrocytes in vivo and in vitro. 2002; Arthritis Rheum. (46): 2648-2657.
- Beecher, B R, Martin, J A, Pedersen, D R, Heiner, A D, and Buckwalter, J A.** Antioxidants block cyclic loading induced chondrocyte death. 2007; Iowa Orthop.J. (27): 1-8.
- Behrens, F, Kraft, E L, and Oegema, T R, Jr.** Biochemical changes in articular cartilage after joint immobilization by casting or external fixation. 1989; J.Orthop.Res. (7): 335-343.
- Benbow, U and Brinckerhoff, C E.** The AP-1 site and MMP gene regulation: what is all the fuss about? 1997; Matrix Biol. (15): 519-526.
- Benedetto, K P, Glotzer, W, Kunzel, K H, and Gaber, O.** [The vascularization of the menisci. Morphological basis for the repair.]. 1985; Acta Anat.(Basel) (124): 88-92.
- Berthiaume, M J, Raynauld, J P, Martel-Pelletier, J, Labonte, F, Beaudoin, G, Bloch, D A, Choquette, D, Haraoui, B, Altman, R D, Hochberg, M, Meyer, J M, Cline, G A, and Pelletier, J P.** Meniscal tear and extrusion are strongly associated with progression of symptomatic knee osteoarthritis as assessed by quantitative magnetic resonance imaging. 2005; Ann.Rheum.Dis. (64): 556-563.
- Billinghurst, R C, Dahlberg, L, Ionescu, M, Reiner, A, Bourne, R, Rorabeck, C, Mitchell, P, Hambor, J, Diekmann, O, Tschesche, H, Chen, J, Van, W H, and Poole, A R.** Enhanced cleavage of type II collagen by collagenases in osteoarthritic articular cartilage. 1997; J.Clin.Invest (99): 1534-1545.
- Blanco, F J, Guitian, R, Vazquez-Martul, E, de Toro, F J, and Galdo, F.** Osteoarthritis chondrocytes die by apoptosis. A possible pathway for osteoarthritis pathology. 1998; Arthritis Rheum. (41): 284-289.
- Blanco, F J and Lotz, M.** IL-1-induced nitric oxide inhibits chondrocyte proliferation via PGE2. 1995; Exp.Cell Res. (218): 319-325.

- Blanco, F J, Ochs, R L, Schwarz, H, and Lotz, M.** Chondrocyte apoptosis induced by nitric oxide. 1995; *Am.J.Pathol.* (146): 75-85.
- Blom, A B, van Lent, P L, Libregts, S, Holthuysen, A E, van der Kraan, P M, van, R N, and van den Berg, W B.** Crucial role of macrophages in matrix metalloproteinase-mediated cartilage destruction during experimental osteoarthritis: involvement of matrix metalloproteinase 3. 2007; *Arthritis Rheum.* (56): 147-157.
- Bluteau, G, Conrozier, T, Mathieu, P, Vignon, E, Herbage, D, and Mallein-Gerin, F.** Matrix metalloproteinase-1, -3, -13 and aggrecanase-1 and -2 are differentially expressed in experimental osteoarthritis. 2001; *Biochim.Biophys.Acta* (1526): 147-158.
- Bondeson, J, Wainwright, S D, Lauder, S, Amos, N, and Hughes, C E.** The role of synovial macrophages and macrophage-produced cytokines in driving aggrecanases, matrix metalloproteinases, and other destructive and inflammatory responses in osteoarthritis. 2006; *Arthritis Res.Ther.* (8): 187-194.
- Bullough, P G, Munuera, L, Murphy, J, and Weinstein, A M.** The strength of the menisci of the knee as it relates to their fine structure. 1970; *J.Bone Joint Surg.Br.* (52): 564-567.
- Burrage, P S and Brinckerhoff, C E.** Molecular targets in osteoarthritis: metalloproteinases and their inhibitors. 2007; *Curr.Drug Targets.* (8): 293-303.
- Burrage, P S, Mix, K S, and Brinckerhoff, C E.** Matrix metalloproteinases: role in arthritis. 2006; *Front Biosci.* (11): 529-543.
- Bush, P G, Hodkinson, P D, Hamilton, G L, and Hall, A C.** Viability and volume of in situ bovine articular chondrocytes-changes following a single impact and effects of medium osmolarity. 2005; *Osteoarthritis.Cartilage.* (13): 54-65.
- Cai, J and Jones, D P.** Superoxide in apoptosis. Mitochondrial generation triggered by cytochrome c loss. 1998; *J.Biol.Chem.* (273): 11401-11404.
- Cao, M, Stefanovic-Racic, M, Georgescu, H I, Miller, L A, and Evans, C H.** Generation of nitric oxide by lapine meniscal cells and its effect on matrix metabolism: stimulation of collagen production by arginine. 1998; *J.Orthop.Res.* (16): 104-111.
- Caterson, B, Flannery, C R, Hughes, C E, and Little, C B.** Mechanisms involved in cartilage proteoglycan catabolism. 2000; *Matrix Biol.* (19): 333-344.
- Chan, W P, Huang, G S, Hsu, S M, Chang, Y C, and Ho, W P.** Radiographic joint space narrowing in osteoarthritis of the knee: relationship to meniscal tears and duration of pain. 2008; *Skeletal Radiol.* (37): 917-922.
- Chen, C T, Burton-Wurster, N, Borden, C, Hueffer, K, Bloom, S E, and Lust, G.** Chondrocyte necrosis and apoptosis in impact damaged articular cartilage. 2001; *J.Orthop.Res.* (19): 703-711.
- Chen, C T, Burton-Wurster, N, Lust, G, Bank, R A, and Tekoppele, J M.** Compositional and metabolic changes in damaged cartilage are peak-stress, stress-rate, and loading-duration dependent. 1999; *J.Orthop.Res.* (17): 870-879.
- Cherney, R J, Mo, R, Meyer, D T, Wang, L, Yao, W, Wasserman, Z R, Liu, R Q, Covington, M B, Tortorella, M D, Arner, E C, Qian, M, Christ, D D, Trzaskos, J M, Newton, R C, Magolda, R L, and Decicco, C P.** Potent and selective aggrecanase inhibitors containing cyclic P1 substituents. 2003; *Bioorg.Med.Chem.Lett.* (13): 1297-1300.
- Chowdhury, T T, Arghandawi, S, Brand, J, Akanji, O O, Bader, D L, Salter, D M, and Lee, D A.** Dynamic compression counteracts IL-1beta induced inducible nitric oxide synthase and cyclo-oxygenase-2 expression in chondrocyte/agarose constructs. 2008; *Arthritis Res.Ther.* (10): 35-41.
- Chowdhury, T T, Bader, D L, and Lee, D A.** Dynamic compression inhibits the synthesis of nitric oxide and PGE(2) by IL-1beta-stimulated chondrocytes cultured in agarose constructs. 2001; *Biochem.Biophys.Res.Commun.* (285): 1168-1174.

- Christoforakis, J, Pradhan, R, Sanchez-Ballester, J, Hunt, N, and Strachan, R K.** Is there an association between articular cartilage changes and degenerative meniscus tears? 2005; *Arthroscopy* (21): 1366-1369.
- Chung, L, Shimokawa, K, Dinakarpandian, D, Grams, F, Fields, G B, and Nagase, H.** Identification of the (183)RWTNNFREY(191) region as a critical segment of matrix metalloproteinase 1 for the expression of collagenolytic activity. 2000; *J.Biol.Chem.* (275): 29610-29617.
- Das, P, Schurman, D J, and Smith, R L.** Nitric oxide and G proteins mediate the response of bovine articular chondrocytes to fluid-induced shear. 1997; *J.Orthop.Res.* (15): 87-93.
- Dave, M, Attur, M, Palmer, G, Al-Mussawir, H E, Kennish, L, Patel, J, and Abramson, S B.** The antioxidant resveratrol protects against chondrocyte apoptosis via effects on mitochondrial polarization and ATP production. 2008; *Arthritis Rheum.* (58): 2786-2797.
- Davis, M A, Ettinger, W H, Neuhaus, J M, Cho, S A, and Hauck, W W.** The association of knee injury and obesity with unilateral and bilateral osteoarthritis of the knee. 1989; *Am.J.Epidemiol.* (130): 278-288.
- Day, B, Mackenzie, W G, Shim, S S, and Leung, G.** The vascular and nerve supply of the human meniscus. 1985; *Arthroscopy* (1): 58-62.
- Dean, D D, Martel-Pelletier, J, Pelletier, J P, Howell, D S, and Woessner, J F, Jr.** Evidence for metalloproteinase and metalloproteinase inhibitor imbalance in human osteoarthritic cartilage. 1989; *J.Clin.Invest* (84): 678-685.
- DiMicco, M A, Patwari, P, Siparsky, P N, Kumar, S, Pratta, M A, Lark, M W, Kim, Y J, and Grodzinsky, A J.** Mechanisms and kinetics of glycosaminoglycan release following in vitro cartilage injury. 2004; *Arthritis Rheum.* (50): 840-848.
- Duerr, S, Stremme, S, Soeder, S, Bau, B, and Aigner, T.** MMP-2/gelatinase A is a gene product of human adult articular chondrocytes and is increased in osteoarthritic cartilage. 2004; *Clin.Exp.Rheumatol.* (22): 603-608.
- Fahmi, H, Di Battista, J A, Pelletier, J P, Mineau, F, Ranger, P, and Martel-Pelletier, J.** Peroxisome proliferator-activated receptor gamma activators inhibit interleukin-1beta-induced nitric oxide and matrix metalloproteinase 13 production in human chondrocytes. 2001; *Arthritis Rheum.* (44): 595-607.
- Faulkner, K M, Liochev, S I, and Fridovich, I.** Stable Mn(III) porphyrins mimic superoxide dismutase in vitro and substitute for it in vivo. 1994; *J.Biol.Chem.* (269): 23471-23476.
- Fermor, B, Jeffcoat, D, Hennerbichler, A, Pisetsky, D S, Weinberg, J B, and Guilak, F.** The effects of cyclic mechanical strain and tumor necrosis factor alpha on the response of cells of the meniscus. 2004; *Osteoarthritis.Cartilage.* (12): 956-962.
- Fink, C, Fermor, B, Weinberg, J B, Pisetsky, D S, Misukonis, M A, and Guilak, F.** The effect of dynamic mechanical compression on nitric oxide production in the meniscus. 2001; *Osteoarthritis.Cartilage.* (9): 481-487.
- Fithian, D C, Kelly, M A, and Mow, V C.** Material properties and structure-function relationships in the menisci. 1990; *Clin.Orthop.Relat Res.* (252): 19-31.
- Flannery, C R, Little, C B, Caterson, B, and Hughes, C E.** Effects of culture conditions and exposure to catabolic stimulators (IL-1 and retinoic acid) on the expression of matrix metalloproteinases (MMPs) and disintegrin metalloproteinases (ADAMs) by articular cartilage chondrocytes. 1999; *Matrix Biol.* (18): 225-237.
- Flannery, C R, Little, C B, Hughes, C E, and Caterson, B.** Expression of ADAMTS homologues in articular cartilage. 1999; *Biochem.Biophys.Res.Comm.* (260): 318-322.
- Frank, E H, Jin, M, Loening, A M, Levenston, M E, and Grodzinsky, A J.** A versatile shear and compression apparatus for mechanical stimulation of tissue culture explants. 2000; *J.Biomech.* (33): 1523-1527.
- Fukuda, K, Dan, H, Saitoh, M, Takayama, M, and Tanaka, S.** Superoxide dismutase inhibits interleukin-1-induced degradation of human cartilage. 1994; *Agents Actions* (42): 71-73.
- Gardner, P R, Nguyen, D D, and White, C W.** Superoxide scavenging by Mn(II/III) tetrakis (1-methyl-4-pyridyl) porphyrin in mammalian cells. 1996; *Arch.Biochem.Biophys.* (325): 20-28.

- Gelber, A C, Hochberg, M C, Mead, L A, Wang, N Y, Wigley, F M, and Klag, M J.** Body mass index in young men and the risk of subsequent knee and hip osteoarthritis. 1999; *Am.J.Med.* (107): 542-548.
- Gelber, A C, Hochberg, M C, Mead, L A, Wang, N Y, Wigley, F M, and Klag, M J.** Joint injury in young adults and risk for subsequent knee and hip osteoarthritis. 2000; *Ann.Intern.Med.* (133): 321-328.
- Ghosh, P and Taylor, T K.** The knee joint meniscus. A fibrocartilage of some distinction. 1987; *Clin.Orthop.Relat Res.* (224): 52-63.
- Gilbert, A M, Bursavich, M G, Lombardi, S, Georgiadis, K E, Reifenberg, E, Flannery, C R, and Morris, E A.** N-((8-hydroxy-5-substituted-quinolin-7-yl)(phenyl)methyl)-2-phenyloxy/amin o-acetamide inhibitors of ADAMTS-5 (Aggrecanase-2). 2008; *Bioorg.Med.Chem.Lett.* (18): 6454-6457.
- Goldring, M B, Birkhead, J, Sandell, L J, Kimura, T, and Krane, S M.** Interleukin 1 suppresses expression of cartilage-specific types II and IX collagens and increases types I and III collagens in human chondrocytes. 1988; *J.Clin.Invest* (82): 2026-2037.
- Goldring, M B and Krane, S M.** Modulation by recombinant interleukin 1 of synthesis of types I and III collagens and associated procollagen mRNA levels in cultured human cells. 1987; *J.Biol.Chem.* (262): 16724-16729.
- Grasl-Kraupp, B, Ruttkay-Nedecky, B, Koudelka, H, Bukowska, K, Bursch, W, and Schulte-Hermann, R.** In situ detection of fragmented DNA (TUNEL assay) fails to discriminate among apoptosis, necrosis, and autolytic cell death: a cautionary note. 1995; *Hepatology* (21): 1465-1468.
- Grazioli, V, Schiavo, R, Casari, E, Marzatico, F, Baena, R, and Gaetani, P.** Antioxidant enzymatic activities and lipid peroxidation in cultured human chondrocytes from vertebral plate cartilage. 1998; *FEBS Lett.* (431): 149-153.
- Gupta, T, Zielinska, B, McHenry, J, Kadmiel, M, and Haut Donahue, T L.** IL-1 and iNOS gene expression and NO synthesis in the superior region of meniscal explants are dependent on the magnitude of compressive strains. 2008; *Osteoarthritis.Cartilage.* (16): 1213-1219.
- Hardingham, T E and Fosang, A J.** The structure of aggrecan and its turnover in cartilage. 1995; *J.Rheumatol.Suppl* (43): 86-90.
- Hashimoto, S, Ochs, R L, Komiya, S, and Lotz, M.** Linkage of chondrocyte apoptosis and cartilage degradation in human osteoarthritis. 1998; *Arthritis Rheum.* (41): 1632-1638.
- Hashimoto, S, Ochs, R L, Rosen, F, Quach, J, McCabe, G, Solan, J, Seegmiller, J E, Terkeltaub, R, and Lotz, M.** Chondrocyte-derived apoptotic bodies and calcification of articular cartilage. 1998; *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* (95): 3094-3099.
- Hashimoto, S, Takahashi, K, Ochs, R L, Coutts, R D, Amiel, D, and Lotz, M.** Nitric oxide production and apoptosis in cells of the meniscus during experimental osteoarthritis. 1999; *Arthritis Rheum.* (42): 2123-2131.
- Hauselmann, H J, Oppliger, L, Michel, B A, Stefanovic-Racic, M, and Evans, C H.** Nitric oxide and proteoglycan biosynthesis by human articular chondrocytes in alginate culture. 1994; *FEBS Lett.* (352): 361-364.
- Heckmann, T P, Barber-Westin, S D, and Noyes, F R.** Meniscal repair and transplantation: indications, techniques, rehabilitation, and clinical outcome. 2006; *J.Orthop.Sports Phys.Ther.* (36): 795-814.
- Hennerbichler, A, Fermor, B, Hennerbichler, D, Weinberg, J B, and Guilak, F.** Regional differences in prostaglandin E2 and nitric oxide production in the knee meniscus in response to dynamic compression. 2007; *Biochem.Biophys.Res.Commun.* (358): 1047-1053. **(a)**
- Hennerbichler, A, Moutos, F T, Hennerbichler, D, Weinberg, J B, and Guilak, F.** Interleukin-1 and tumor necrosis factor alpha inhibit repair of the porcine meniscus in vitro. 2007; *Osteoarthritis.Cartilage.* (15): 1053-1060. **(b)**
- Hennerbichler, A, Moutos, F T, Hennerbichler, D, Weinberg, J B, and Guilak, F.** Repair response of the inner and outer regions of the porcine meniscus in vitro. 2007; *Am.J.Sports Med.* (35): 754-762. **(c)**

- Henrotin, Y, Kurz, B, and Aigner, T.** Oxygen and reactive oxygen species in cartilage degradation: friends or foes? 2005; Osteoarthritis.Cartilage. (13): 643-654.
- Herwig, J, Egner, E, and Buddecke, E.** Chemical changes of human knee joint menisci in various stages of degeneration. 1984; Ann.Rheum.Dis. (43): 635-640.
- Homandberg, G A, Hui, F, and Wen, C.** Fibronectin fragment mediated cartilage chondrolysis. I. Suppression by anti-oxidants. 1996; Biochim.Biophys.Acta (1317): 134-142.
- Hough, A J, Jr. and Webber, R J.** Pathology of the meniscus. 1990; Clin.Orthop.Relat Res. (252): 32-40.
- Huang, K and Wu, L D.** Aggrecanase and aggrecan degradation in osteoarthritis: a review. 2008; J.Int.Med.Res. (36): 1149-1160.
- Huch, K, Wilbrink, B, Flechtenmacher, J, Koepp, H E, Aydelotte, M B, Sampath, T K, Kuettner, K E, Mollenhauer, J, and Thonar, E J.** Effects of recombinant human osteogenic protein 1 on the production of proteoglycan, prostaglandin E2, and interleukin-1 receptor antagonist by human articular chondrocytes cultured in the presence of interleukin-1beta. 1997; Arthritis Rheum. (40): 2157-2161.
- Imler, S M, Doshi, A N, and Levenston, M E.** Combined effects of growth factors and static mechanical compression on meniscus explant biosynthesis. 2004; Osteoarthritis.Cartilage. (12): 736-744.
- Jeffrey, J E and Aspden, R M.** Cyclooxygenase inhibition lowers prostaglandin E2 release from articular cartilage and reduces apoptosis but not proteoglycan degradation following an impact load in vitro. 2007; Arthritis Res.Ther. (9): 129-134.
- Jeffrey, J E, Thomson, L A, and Aspden, R M.** Matrix loss and synthesis following a single impact load on articular cartilage in vitro. 1997; Biochim.Biophys.Acta (1334): 223-232.
- Jones, A R, Chen, S, Chai, D H, Stevens, A L, Gleghorn, J P, Bonassar, L J, Grodzinsky, A J, and Flannery, C R.** Modulation of lubricin biosynthesis and tissue surface properties following cartilage mechanical injury. 2009; Arthritis Rheum. (60): 133-142.
- Karan, A, Karan, M A, Vural, P, Erten, N, Tascioglu, C, Aksoy, C, Canbaz, M, and Oncel, A.** Synovial fluid nitric oxide levels in patients with knee osteoarthritis. 2003; Clin.Rheumatol. (22): 397-399.
- Karube, S and Shoji, H.** Compositional changes of glycosaminoglycans of the human menisci with age and degenerative joint disease. 1982; Nippon Seikeigeka Gakkai Zasshi (56): 51-57.
- Kobayashi, K, Mishima, H, Hashimoto, S, Goomer, R S, Harwood, F L, Lotz, M, Moriya, H, and Amiel, D.** Chondrocyte apoptosis and regional differential expression of nitric oxide in the medial meniscus following partial meniscectomy. 2001; J.Orthop.Res. (19): 802-808.
- Koshy, P J, Lundy, C J, Rowan, A D, Porter, S, Edwards, D R, Hogan, A, Clark, I M, and Cawston, T E.** The modulation of matrix metalloproteinase and ADAM gene expression in human chondrocytes by interleukin-1 and oncostatin M: a time-course study using real-time quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction. 2002; Arthritis Rheum. (46): 961-967.
- Kozaci, L D, Buttle, D J, and Hollander, A P.** Degradation of type II collagen, but not proteoglycan, correlates with matrix metalloproteinase activity in cartilage explant cultures. 1997; Arthritis Rheum. (40): 164-174.
- Kurz, B, Jin, M, Patwari, P, Cheng, D M, Lark, M W, and Grodzinsky, A J.** Biosynthetic response and mechanical properties of articular cartilage after injurious compression. 2001; J.Orthop.Res. (19): 1140-1146.
- Kurz, B, Lemke, A, Kehn, M, Domm, C, Patwari, P, Frank, E H, Grodzinsky, A J, and Schunke, M.** Influence of tissue maturation and antioxidants on the apoptotic response of articular cartilage after injurious compression. 2004; Arthritis Rheum. (50): 123-130.
- Kurz, B, Lemke, A K, Fay, J, Pufe, T, Grodzinsky, A J, and Schunke, M.** Pathomechanisms of cartilage destruction by mechanical injury. 2005; Ann.Anat. (187): 473-485.

- Kwan, J A, Schulze, C J, Wang, W, Leon, H, Sariahmetoglu, M, Sung, M, Sawicka, J, Sims, D E, Sawicki, G, and Schulz, R.** Matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) is present in the nucleus of cardiac myocytes and is capable of cleaving poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) in vitro. 2004; FASEB J. (18): 690-692.
- Lark, M W, Bayne, E K, Flanagan, J, Harper, C F, Hoerrner, L A, Hutchinson, N I, Singer, I I, Donatelli, S A, Weidner, J R, Williams, H R, Mumford, R A, and Lohmander, L S.** Aggrecan degradation in human cartilage. Evidence for both matrix metalloproteinase and aggrecanase activity in normal, osteoarthritic, and rheumatoid joints. 1997; J.Clin.Invest (100): 93-106.
- Lee, J H, Fitzgerald, J B, DiMicco, M A, and Grodzinsky, A J.** Mechanical injury of cartilage explants causes specific time-dependent changes in chondrocyte gene expression. 2005; Arthritis Rheum. (52): 2386-2395.
- Lee, M S, Trindade, M C, Ikenoue, T, Schurman, D J, Goodman, S B, and Smith, R L.** Effects of shear stress on nitric oxide and matrix protein gene expression in human osteoarthritic chondrocytes in vitro. 2002; J.Orthop.Res. (20): 556-561.
- Lefebvre, V, Peeters-Joris, C, and Vaes, G.** Modulation by interleukin 1 and tumor necrosis factor alpha of production of collagenase, tissue inhibitor of metalloproteinases and collagen types in differentiated and dedifferentiated articular chondrocytes. 1990; Biochim.Biophys.Acta (1052): 366-378.
- Lefebvre, V, Peeters-Joris, C, and Vaes, G.** Production of gelatin-degrading matrix metalloproteinases ('type IV collagenases') and inhibitors by articular chondrocytes during their dedifferentiation by serial subcultures and under stimulation by interleukin-1 and tumor necrosis factor alpha. 1991; Biochim.Biophys.Acta (1094): 8-18.
- LeGrand, A, Fermor, B, Fink, C, Pisetsky, D S, Weinberg, J B, Vail, T P, and Guilak, F.** Interleukin-1, tumor necrosis factor alpha, and interleukin-17 synergistically up-regulate nitric oxide and prostaglandin E2 production in explants of human osteoarthritic knee menisci. 2001; Arthritis Rheum. (44): 2078-2083.
- Limb, G A, Matter, K, Murphy, G, Cambrey, A D, Bishop, P N, Morris, G E, and Khaw, P T.** Matrix metalloproteinase-1 associates with intracellular organelles and confers resistance to lamin A/C degradation during apoptosis. 2005; Am.J.Pathol. (166): 1555-1563.
- Little, C B, Flannery, C R, Hughes, C E, Mort, J S, Roughley, P J, Dent, C, and Caterson, B.** Aggrecanase versus matrix metalloproteinases in the catabolism of the interglobular domain of aggrecan in vitro. 1999; Biochem.J. (344 Pt 1): 61-68.
- Little, C B, Hughes, C E, Curtis, C L, Jones, S A, Caterson, B, and Flannery, C R.** Cyclosporin A inhibition of aggrecanase-mediated proteoglycan catabolism in articular cartilage. 2002; Arthritis Rheum. (46): 124-129.
- Loening, A M, James, I E, Levenston, M E, Badger, A M, Frank, E H, Kurz, B, Nuttall, M E, Hung, H H, Blake, S M, Grodzinsky, A J, and Lark, M W.** Injurious mechanical compression of bovine articular cartilage induces chondrocyte apoptosis. 2000; Arch.Biochem.Biophys. (381): 205-212.
- Lohmander, L S, Neame, P J, and Sandy, J D.** The structure of aggrecan fragments in human synovial fluid. Evidence that aggrecanase mediates cartilage degradation in inflammatory joint disease, joint injury, and osteoarthritis. 1993; Arthritis Rheum. (36): 1214-1222.
- Longpre, J M, McCulloch, D R, Koo, B H, Alexander, J P, Apte, S S, and Leduc, R.** Characterization of proADAMTS5 processing by proprotein convertases. 2008; Int.J.Biochem.Cell Biol. (31): 214-219.
- Lotz, M.** The role of nitric oxide in articular cartilage damage. 1999; Rheum.Dis.Clin.North Am. (25): 269-282.
- Luo, D, Mari, B, Stoll, I, and Anglard, P.** Alternative splicing and promoter usage generates an intracellular stromelysin 3 isoform directly translated as an active matrix metalloproteinase. 2002; J.Biol.Chem. (277): 25527-25536.
- Malassagne, B, Ferret, P J, Hammoud, R, Tulliez, M, Bedda, S, Trebeden, H, Jaffray, P, Calmus, Y, Weill, B, and Batteux, F.** The superoxide dismutase mimetic MnTBAP prevents Fas-induced acute liver failure in the mouse. 2001; Gastroenterology (121): 1451-1459.
- Malemud, C J.** Matrix metalloproteinases (MMPs) in health and disease: an overview. 2006; Front Biosci. (11): 1696-1701.

- Malfait, A M, Arner, E C, Song, R H, Alston, J T, Markosyan, S, Staten, N, Yang, Z, Griggs, D W, and Tortorella, M D.** Proprotein convertase activation of aggrecanases in cartilage in situ. 2008; Arch.Biochem.Biophys. (478): 43-51.
- Martel-Pelletier, J, Zafarullah, M, Kodama, S, and Pelletier, J P.** In vitro effects of interleukin 1 on the synthesis of metalloproteases, TIMP, plasminogen activators and inhibitors in human articular cartilage. 1991; J.Rheumatol.Suppl (27): 80-84.
- Martin, J A, Brown, T D, Heiner, A D, and Buckwalter, J A.** Chondrocyte senescence, joint loading and osteoarthritis. 2004; Clin.Orthop.Relat Res. (48): 96-103.
- Mathy-Hartert, M, Deby-Dupont, G P, Reginster, J Y, Ayache, N, Pujol, J P, and Henrotin, Y E.** Regulation by reactive oxygen species of interleukin-1beta, nitric oxide and prostaglandin E(2) production by human chondrocytes. 2002; Osteoarthritis.Cartilage. (10): 547-555.
- McDevitt, C A and Webber, R J.** The ultrastructure and biochemistry of meniscal cartilage. 1990; Clin.Orthop.Relat Res. (252): 8-18.
- McHenry, J A, Zielinska, B, and Donahue, T L.** Proteoglycan breakdown of meniscal explants following dynamic compression using a novel bioreactor. 2006; Ann.Biomed.Eng (34): 1758-1766.
- McNulty, A L, Weinberg, J B, and Guilak, F.** Inhibition of Matrix Metalloproteinases Enhances In Vitro Repair of the Meniscus. 2008; Clin.Orthop.Relat Res. (6): 1557-1567.
- Mitchell, P G, Magna, H A, Reeves, L M, Lopresti-Morrow, L L, Yocum, S A, Rosner, P J, Geoghegan, K F, and Hambor, J E.** Cloning, expression, and type II collagenolytic activity of matrix metalloproteinase-13 from human osteoarthritic cartilage. 1996; J.Clin.Invest (97): 761-768.
- Mohtai, M, Smith, R L, Schurman, D J, Tsuji, Y, Torti, F M, Hutchinson, N I, Stetler-Stevenson, W G, and Goldberg, G I.** Expression of 92-kD type IV collagenase/gelatinase (gelatinase B) in osteoarthritic cartilage and its induction in normal human articular cartilage by interleukin 1. 1993; J.Clin.Invest (92): 179-185.
- Mort, J S and Billington, C J.** Articular cartilage and changes in arthritis: matrix degradation. 2001; Arthritis Res. (3): 337-341.
- Mow, V C, Holmes, M H, and Lai, W M.** Fluid transport and mechanical properties of articular cartilage: a review. 1984; J.Biomech. (17): 377-394.
- Murphy, G, Cockett, M I, Stephens, P E, Smith, B J, and Docherty, A J.** Stromelysin is an activator of procollagenase. A study with natural and recombinant enzymes. 1987; Biochem.J. (248): 265-268.
- Murphy, G and Nagase, H.** Reappraising metalloproteinases in rheumatoid arthritis and osteoarthritis: destruction or repair? 2008; Nat.Clin.Pract.Rheumatol. (4): 128-135.
- Murphy, S B, Ganz, R, and Muller, M E.** The prognosis in untreated dysplasia of the hip. A study of radiographic factors that predict the outcome. 1995; J.Bone Joint Surg.Am. (77): 985-989.
- Murrell, G A, Jang, D, and Williams, R J.** Nitric oxide activates metalloprotease enzymes in articular cartilage. 1995; Biochem.Biophys.Res.Comm. (206): 15-21.
- Nagase, H.** Activation mechanisms of matrix metalloproteinases. 1997; Biol.Chem. (378): 151-160.
- Nagase, H and Kashiwagi, M.** Aggrecanases and cartilage matrix degradation. 2003; Arthritis Res.Ther. (5): 94-103.
- Nagase, H, Visse, R, and Murphy, G.** Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. 2006; Cardiovasc.Res. (69): 562-573.
- Natoli, R M, Scott, C C, and Athanasiou, K A.** Temporal effects of impact on articular cartilage cell death, gene expression, matrix biochemistry, and biomechanics. 2008; Ann.Biomed.Eng (36): 780-792.
- Ohuchi, E, Imai, K, Fujii, Y, Sato, H, Seiki, M, and Okada, Y.** Membrane type 1 matrix metalloproteinase digests interstitial collagens and other extracellular matrix macromolecules. 1997; J.Biol.Chem. (272): 2446-2451.

- Ohyama, K, Yuan, B, Bessho, T, and Yamakawa, T.** Progressive apoptosis in chorion laeve trophoblast cells of human fetal membrane tissues during in vitro incubation is suppressed by antioxidative reagents. 2001; Eur.J.Biochem. (268): 6182-6189.
- Palmer, R M, Hickery, M S, Charles, I G, Moncada, S, and Bayliss, M T.** Induction of nitric oxide synthase in human chondrocytes. 1993; Biochem.Biophys.Res.Comm. (193): 398-405.
- Patwari, P, Cook, M N, DiMicco, M A, Blake, S M, James, I E, Kumar, S, Cole, A A, Lark, M W, and Grodzinsky, A J.** Proteoglycan degradation after injurious compression of bovine and human articular cartilage in vitro: interaction with exogenous cytokines. 2003; Arthritis Rheum. (48): 1292-1301.
- Patwari, P, Fay, J, Cook, M N, Badger, A M, Kerin, A J, Lark, M W, and Grodzinsky, A J.** In vitro models for investigation of the effects of acute mechanical injury on cartilage. 2001; Clin.Orthop.Relat Res. (391): 61-71.
- Patwari, P, Gao, G, Lee, J H, Grodzinsky, A J, and Sandy, J D.** Analysis of ADAMTS4 and MT4-MMP indicates that both are involved in aggrecanolytic in interleukin-1-treated bovine cartilage. 2005; Osteoarthritis.Cartilage. (13): 269-277.
- Patwari, P, Gaschen, V, James, I E, Berger, E, Blake, S M, Lark, M W, Grodzinsky, A J, and Hunziker, E B.** Ultrastructural quantification of cell death after injurious compression of bovine calf articular cartilage. 2004; Osteoarthritis.Cartilage. (12): 245-252.
- Patwari, P, Kurz, B, Sandy, J D, and Grodzinsky, A J.** Mannosamine inhibits aggrecanase-mediated changes in the physical properties and biochemical composition of articular cartilage. 2000; Arch.Biochem.Biophys. (374): 79-85.
- Pejovic, M, Stankovic, A, and Mitrovic, D R.** Lactate dehydrogenase activity and its isoenzymes in serum and synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis. 1992; J.Rheumatol. (19): 529-533.
- Pelletier, J P, Mineau, F, Faure, M P, and Martel-Pelletier, J.** Imbalance between the mechanisms of activation and inhibition of metalloproteinases in the early lesions of experimental osteoarthritis. 1990; Arthritis Rheum. (33): 1466-1476.
- Petersen, W and Tillmann, B.** Collagenous fibril texture of the human knee joint menisci. 1998; Anat.Embryol.(Berl) (197): 317-324.
- Petersen, W and Tillmann, B.** [Structure and vascularization of the knee joint menisci]. 1999; Z.Orthop.Ihre Grenzgeb. (137): 31-37.
- Porter, S, Clark, I M, Kevorkian, L, and Edwards, D R.** The ADAMTS metalloproteinases. 2005; Biochem.J. (386): 15-27.
- Pratta, M A, Scherle, P A, Yang, G, Liu, R Q, and Newton, R C.** Induction of aggrecanase 1 (ADAM-TS4) by interleukin-1 occurs through activation of constitutively produced protein. 2003; Arthritis Rheum. (48): 119-133.
- Pratta, M A, Yao, W, Decicco, C, Tortorella, M D, Liu, R Q, Copeland, R A, Magolda, R, Newton, R C, Trzaskos, J M, and Arner, E C.** Aggrecan protects cartilage collagen from proteolytic cleavage. 2003; J.Biol.Chem. (278): 45539-45545.
- Proctor, C S, Schmidt, M B, Whipple, R R, Kelly, M A, and Mow, V C.** Material properties of the normal medial bovine meniscus. 1989; J.Orthop.Res. (7): 771-782.
- Quinn, T M, Allen, R G, Schalet, B J, Perumbuli, P, and Hunziker, E B.** Matrix and cell injury due to sub-impact loading of adult bovine articular cartilage explants: effects of strain rate and peak stress. 2001; J.Orthop.Res. (19): 242-249.
- Quinn, T M, Grodzinsky, A J, Hunziker, E B, and Sandy, J D.** Effects of injurious compression on matrix turnover around individual cells in calf articular cartilage explants. 1998; J.Orthop.Res. (16): 490-499.
- Regan, E A, Bowler, R P, and Crapo, J D.** Joint fluid antioxidants are decreased in osteoarthritic joints compared to joints with macroscopically intact cartilage and subacute injury. 2008; Osteoarthritis.Cartilage. (16): 515-521.

- Richardson, D W and Dodge, G R.** Effects of interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha on expression of matrix-related genes by cultured equine articular chondrocytes. 2000; *Am.J.Vet.Res.* (61): 624-630.
- Sandstrom, P A, Mannie, M D, and Buttke, T M.** Inhibition of activation-induced death in T cell hybridomas by thiol antioxidants: oxidative stress as a mediator of apoptosis. 1994; *J.Leukoc.Biol.* (55): 221-226.
- Sandy, J D.** A contentious issue finds some clarity: on the independent and complementary roles of aggrecanase activity and MMP activity in human joint aggrecanolysis. 2005; *Osteoarthritis.Cartilage.* (2): 95-100.
- Sandy, J D, Flannery, C R, Neame, P J, and Lohmander, L S.** The structure of aggrecan fragments in human synovial fluid. Evidence for the involvement in osteoarthritis of a novel proteinase which cleaves the Glu 373-Ala 374 bond of the interglobular domain. 1992; *J.Clin.Invest* (89): 1512-1516.
- Sasaki, K, Hattori, T, Fujisawa, T, Takahashi, K, Inoue, H, and Takigawa, M.** Nitric oxide mediates interleukin-1-induced gene expression of matrix metalloproteinases and basic fibroblast growth factor in cultured rabbit articular chondrocytes. 1998; *J.Biochem.* (123): 431-439.
- Schünke, M, Schulte, E, and Schumacher, U.** Prometheus: Allgemeine Anatomie und Bewegungssystem. Georg Thieme Verlag, Stuttgart. 2005.
- Shin, S J, Fermor, B, Weinberg, J B, Pisetsky, D S, and Guilak, F.** Regulation of matrix turnover in meniscal explants: role of mechanical stress, interleukin-1, and nitric oxide. 2003; *J.Appl.Physiol* (95): 308-313.
- Slowman, S D and Brandt, K D.** Composition and glycosaminoglycan metabolism of articular cartilage from habitually loaded and habitually unloaded sites. 1986; *Arthritis Rheum.* (29): 88-94.
- Somerville, R P, Oblander, S A, and Apte, S S.** Matrix metalloproteinases: old dogs with new tricks. 2003; *Genome Biol.* (4): 216-219.
- Song, R H, Tortorella, M D, Malfait, A M, Alston, J T, Yang, Z, Arner, E C, and Griggs, D W.** Aggrecan degradation in human articular cartilage explants is mediated by both ADAMTS-4 and ADAMTS-5. 2007; *Arthritis Rheum.* (56): 575-585.
- Springman, E B, Angleton, E L, Birkedal-Hansen, H, and Van Wart, H E.** Multiple modes of activation of latent human fibroblast collagenase: evidence for the role of a Cys73 active-site zinc complex in latency and a "cysteine switch" mechanism for activation. 1990; *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* (87): 364-368.
- Stadler, J, Stefanovic-Racic, M, Billiar, T R, Curran, R D, McIntyre, L A, Georgescu, H I, Simmons, R L, and Evans, C H.** Articular chondrocytes synthesize nitric oxide in response to cytokines and lipopolysaccharide. 1991; *J.Immunol.* (147): 3915-3920.
- Stanton, H, Rogerson, F M, East, C J, Golub, S B, Lawlor, K E, Meeker, C T, Little, C B, Last, K, Farmer, P J, Campbell, I K, Fourie, A M, and Fosang, A J.** ADAMTS5 is the major aggrecanase in mouse cartilage in vivo and in vitro. 2005; *Nature* (434): 648-652.
- Stevens, A L, Wishnok, J S, White, F M, Grodzinsky, A J, and Tannenbaum, S R.** Mechanical injury and cytokines cause loss of cartilage integrity and upregulate proteins associated with catabolism, immunity, inflammation, and repair. 2009; *Mol.Cell Proteomics.* (7): 1475-1489.
- Tamura, T, Nakanishi, T, Kimura, Y, Hattori, T, Sasaki, K, Norimatsu, H, Takahashi, K, and Takigawa, M.** Nitric oxide mediates interleukin-1-induced matrix degradation and basic fibroblast growth factor release in cultured rabbit articular chondrocytes: a possible mechanism of pathological neovascularization in arthritis. 1996; *Endocrinology* (137): 3729-3737.
- Taskiran, D, Stefanovic-Racic, M, Georgescu, H, and Evans, C.** Nitric oxide mediates suppression of cartilage proteoglycan synthesis by interleukin-1. 1994; *Biochem.Biophys.Res.Comm.* (200): 142-148.
- Tortorella, M D, Arner, E C, Hills, R, Gormley, J, Fok, K, Pegg, L, Munie, G, and Malfait, A M.** ADAMTS-4 (aggrecanase-1): N-terminal activation mechanisms. 2005; *Arch.Biochem.Biophys.* (444): 34-44.

- Tortorella, M D, Burn, T C, Pratta, M A, Abbaszade, I, Hollis, J M, Liu, R, Rosenfeld, S A, Copeland, R A, Decicco, C P, Wynn, R, Rockwell, A, Yang, F, Duke, J L, Solomon, K, George, H, Bruckner, R, Nagase, H, Itoh, Y, Ellis, D M, Ross, H, Wiswall, B H, Murphy, K, Hillman, M C, Jr., Hollis, G F, Newton, R C, Magolda, R L, Trzaskos, J M, and Arner, E C.** Purification and cloning of aggrecanase-1: a member of the ADAMTS family of proteins. 1999; *Science* (284): 1664-1666.
- Tortorella, M D, Malfait, A M, Deccico, C, and Arner, E.** The role of ADAM-TS4 (aggrecanase-1) and ADAM-TS5 (aggrecanase-2) in a model of cartilage degradation. 2001; *Osteoarthritis.Cartilage*. (9): 539-552.
- Torzilli, P A, Grigiene, R, Borrelli, J, Jr., and Helfet, D L.** Effect of impact load on articular cartilage: cell metabolism and viability, and matrix water content. 1999; *J.Biomech.Eng* (121): 433-441.
- Tsuang, Y H, Lin, Y S, Chen, L T, Cheng, C K, and Sun, J S.** Effect of dynamic compression on in vitro chondrocyte metabolism. 2008; *Int.J.Artif.Organs* (31): 439-449.
- Uysal, M, Akpınar, S, Bolat, F, Cekin, N, Cinar, M, and Cesur, N.** Apoptosis in the traumatic and degenerative tears of human meniscus. 2008; *Knee.Surg.Sports Traumatol.Arthrosc.* (16): 666-669.
- Vailas, A C, Zernicke, R F, Matsuda, J, Curwin, S, and Durivage, J.** Adaptation of rat knee meniscus to prolonged exercise. 1986; *J.Appl.Physiol* (60): 1031-1034.
- van de Loo, A A, Arntz, O J, Bakker, A C, van Lent, P L, Jacobs, M J, and van den Berg, W B.** Role of interleukin 1 in antigen-induced exacerbations of murine arthritis. 1995; *Am.J.Pathol.* (146): 239-249.
- van de Loo, F A, Joosten, L A, van Lent, P L, Arntz, O J, and van den Berg, W B.** Role of interleukin-1, tumor necrosis factor alpha, and interleukin-6 in cartilage proteoglycan metabolism and destruction. Effect of in situ blocking in murine antigen- and zymosan-induced arthritis. 1995; *Arthritis Rheum.* (38): 164-172.
- Visse, R and Nagase, H.** Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. 2003; *Circ.Res.* (92): 827-839.
- Wagner, H J.** [Architecture of collagen fibers in the meniscus of the human knee joint, with special reference to the medial meniscus and its connection to the articular ligaments]. 1976; *Z.Mikrosk.Anat.Forsch.* (90): 302-324.
- Walker, P S and Erkman, M J.** The role of the menisci in force transmission across the knee. 1975; *Clin.Orthop.Relat Res.* (109): 184-192.
- Weh, L, Binzus, G, Dahmen, G, and Jann, A.** [Influence of axial deformities on the LDH isoenzyme of cartilage and synovial membrane in gonarthrosis]. 1983; *Z.Rheumatol.* (42): 171-174.
- Westacott, C I, Whicher, J T, Barnes, I C, Thompson, D, Swan, A J, and Dieppe, P A.** Synovial fluid concentration of five different cytokines in rheumatic diseases. 1990; *Ann.Rheum.Dis.* (49): 676-681.
- Wilusz, R E, Weinberg, J B, Guilak, F, and McNulty, A L.** Inhibition of integrative repair of the meniscus following acute exposure to interleukin-1 in vitro. 2008; *J.Orthop.Res.* (26): 504-512.
- Wittwer, A J, Hills, R L, Keith, R H, Munie, G E, Arner, E C, Anglin, C P, Malfait, A M, and Tortorella, M D.** Substrate-dependent inhibition kinetics of an active site-directed inhibitor of ADAMTS-4 (Aggrecanase 1). 2007; *Biochemistry* (46): 6393-6401.
- Zafarullah, M, Li, W Q, Sylvester, J, and Ahmad, M.** Molecular mechanisms of N-acetylcysteine actions. 2003; *Cell Mol.Life Sci.* (60): 6-20.
- Zielinska, B and Donahue, T L.** 3D finite element model of meniscectomy: changes in joint contact behavior. 2006; *J.Biomech.Eng* (128): 115-123.
- Zielinska, B, Killian, M, Kadmiel, M, Nelsen, M, and Haut Donahue, T L.** Meniscal tissue explants response depends on level of dynamic compressive strain. 2008; *Osteoarthritis.Cartilage*. (6): 754-760.

Danksagung

Die größte Dankbarkeit gilt meinen Eltern, für die bedingungslose Unterstützung meines Studiums und für das Verständnis, dass sie meinen Entscheidungen entgegengebracht haben. Danke für alles!

Für die erstklassige Betreuung bei der Durchführung dieser Arbeit möchte ich mich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. Kurz bedanken. Die Auswahl des Themas, seine direkte Beratung, die Hilfestellungen bei aufkommenden Fragen und das er immer "mal eben ein paar Minuten" Zeit und Geduld hatte, gaben mir stets das Gefühl gut aufgehoben zu sein.

Rita und Frank gebührt mein größter Dank für all die Hilfe im Labor. Jennifer danke ich herzlichst für die Durchsicht meiner Arbeit. Weiterhin möchte ich Angelika und Henning für die Einführung in die Methoden danken.

Allen anderen Mitarbeitern des Anatomischen Institutes, die hier namentlich nicht erwähnt sind, danke ich für die Hilfe und Unterstützung, die ich im Laufe meiner Arbeit erhalten habe sowie die freundschaftlichen Arbeitsbedingungen.

LEBENS LAUF

PERSÖNLICHE ANGABEN

Name: Hufeland
Vorname: Martin
Geburtsdatum: 05.12.1982
Geburtsort: Hildesheim
Staatsangehörigkeit: deutsch
Familienstand: ledig

SCHULISCHE AUSBILDUNG

1989 - 1993 Grundschule Ochtersum, Hildesheim
1993 - 2002 Gymnasium Michelsenschule, Hildesheim
06/2002 Abitur

ZIVILDIENT UND KRANKENPFLEGEPRAKTIKUM

07/2002 – 10/2003 Zivildienst, Arbeiter-Samariter-Bund, Hildesheim
11/2003 – 02/2004 Krankenpflegepraktikum St.Bernward Krankenhaus, Hildesheim

STUDIUM

04/2004 - 03/2006 Immatrikulation an der Georg-August Universität Göttingen für den Studiengang Humanmedizin (Staatsexamen)
03/2006 1. Abschnitt der ärztlichen Prüfung
04/2006 Beginn des klinischen Studienabschnitts, Christian-Albrechts-Universität Kiel
03/2007 Beginn mit den Arbeiten zu der vorliegenden Promotion
04/2010 2. Abschnitt der ärztlichen Prüfung
27.05.2010 Approbation als Arzt

FAMULATUREN

08/2006 – 09/2006 Unfallchirurgische Notfallambulanz, Lubinus Klinik, Kiel
09/2006 Herz-Thorax Chirurgie, UKSH Kiel
03/2007 – 04/2007 Orthopädie und Unfallchirurgie, Lubinus Klinik, Kiel
08/2007 Innere Medizin, St.Bernward Krankenhaus, Hildesheim
03/2008 – 04/2008 Notfallmedizin & Allgemeinmedizin, TOHO University Hospital,
Tokyo, Japan

PRAKTISCHES JAHR

02/2009 – 06/2009 Innere Medizin, UKSH Kiel
06/2009 – 10/2009 Orthopädie & Unfallchirurgie, University College London Hospital,
University College London, Großbritannien
08/2009 – 10/2009 Orthopädie & Unfallchirurgie, Royal London Hospital
Bart's & the London, Queen Mary's School of Medicine, Großbritannien
10/2009 – 01/2010 Chirurgie, Kreiskrankenhaus Eckernförde

TÄTIGKEITEN NEBEN DEM STUDIUM

05/2006 – 02/2009 Chirurgischer Assistent im Operationssaal, Lubinus Klinik Kiel
Abteilungen für Endoprothetik, Hand-, Fuß-, und Wirbelsäulenchirurgie